

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.17.006

MicroRNA-520e 通过靶向抑制 AEG-1 发挥抗结直肠癌特性 *

吕飒美 张 健 吴友伟 刘 倩 易 默[△]

(陕西省人民医院消化内二科 陕西 西安 710068)

摘要 目的:探究 MicroRNA-520e(miR-520e)在结直肠癌中的表达模式及其对细胞功能的影响。**方法:**采用 qRT-PCR 方法检测 47 例结直肠癌患者的癌组织和癌旁组织中 miR-520e 和星形胶质细胞上调基因 -1(AEG-1)的 mRNA 表达水平。将 SW480 细胞分为对照组、miR-520e-mimic 组、NC-mimic 组、miR-520e-inhibitor 组、NC-inhibitor 组、miR-520e-mimic+AEG-1-pcDNA3.1 组和 miR-520e-mimic+NC-pcDNA3.1 组。通过 MTT 法检测 SW480 细胞的增殖,通过 Annexin V-FITC/PI 双染色试剂盒检测细胞凋亡,通过 Transwell 检测细胞迁移和侵袭,通过双荧光素酶报告基因实验验证 miR-520e 和 AEG-1 的靶向关系,通过 qRT-PCR 或 Western blotting 检测 AEG-1、基质金属蛋白酶 2(MMP2)、MMP9、NF- κ B p65(p65)和磷酸化的 NF- κ B p65(p-p65)的表达。**结果:**与癌旁组织相比,结直肠癌组织中 miR-520e 的表达水平降低($t=9.353, P<0.001$)。与对照组相比,miR-520e-mimic 组的 OD_{490nm} 值降低,细胞凋亡率升高,细胞迁移和侵袭数量降低,MMP2、MMP9 和 p-p65 蛋白表达水平降低 ($P<0.001$)。与对照组相比,miR-520e-inhibitor 组的 OD_{490nm} 值升高,细胞凋亡率降低,细胞迁移和侵袭数量升高,MMP2、MMP9 和 p-p65 蛋白表达水平升高。与 NC-mimic 组相比,miR-520e-inhibitor 组的相对荧光素酶活性降低($P<0.001$)。与对照组相比,miR-520e-mimic 组的 AEG-1 的 mRNA 和蛋白表达水平均降低,而 miR-520e-inhibitor 组均升高 ($P<0.001$)。与 miR-520e-mimic+NC-pcDNA3.1 组相比,miR-520e-mimic+AEG-1-pcDNA3.1 组的 AEG-1 的 mRNA 和蛋白表达水平升高,OD_{490nm} 值升高,细胞凋亡率降低,迁移和侵袭细胞数增加,MMP2 和 MMP9 的蛋白表达水平及 p65 的磷酸化水平均增加($P<0.001$)。**结论:**miR-520e 在结直肠癌中表达降低,可通过靶向抑制 AEG-1 来发挥抗结直肠癌特性,其抗癌机制可能通过 NF- κ B 信号通路介导。

关键词:结直肠癌;MicroRNA-520e;星形胶质细胞上调基因 -1;侵袭;NF- κ B 信号通路

中图分类号:R-33;R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)17-3229-09

MicroRNA-520e Exerts Anti-colorectal Cancer Properties
by Targeting AEG-1*LÜ Sa-mei, ZHANG Jian, WU You-wei, LIU Qian, YI Mo[△]

(The Second Department of Gastroenterology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

ABSTRACT Objective: To reveal the expression pattern of MicroRNA-520e (miR-520e) in colorectal cancer and its effect on cell function. **Methods:** The qRT-PCR method was used to detect the expression levels of miR-520e and astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) mRNA in cancer tissues and adjacent tissues of 47 patients with colorectal cancer. SW480 cells were divided into the following groups: Control group, miR-520e-mimic group, negative control mimic group (NC-mimic group), miR-520e-inhibitor group, negative control inhibitor group (NC-inhibitor group), miR-520e-mimic+AEG-1-pcDNA3.1 group and miR-520e-mimic+NC-pcDNA3.1 group. SW480 cells were transfected with Lipofectamine 2000 reagent. 48 h after transfection, the proliferation of SW480 cells was detected by MTT method, apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI double staining kit, cell migration and invasion were detected by Transwell, the target relationship between miR-520e and AEG-1 was verified by dual luciferase reporter gene experiment, and the expression of AEG-1, matrix metalloproteinase 2 (MMP2), MMP9, NF- κ B p65 (p65) and phosphorylated NF- κ B p65 (p-p65) was detected by qRT-PCR or Western blotting. **Results:** Compared with adjacent tissues, the expression level of miR-520e in colorectal cancer tissues was reduced ($t=9.353, P<0.001$). Compared with the control group, the OD_{490nm} value of the miR-520e-mimic group decreased, the rate of cell apoptosis increased, the number of cell migration and invasion decreased, the expression level of MMP2, MMP9 and p-p65 protein decreased ($P<0.001$). Compared with the control group, the OD_{490nm} value of the miR-520e-inhibitor group increased, the apoptosis rate decreased, the number of cell migration and invasion increased, the expression level of MMP2, MMP9 and p-p65 protein increased ($P<0.001$). The dual luciferase reporter gene experiment showed that after co-transfection with WT-AEG-1-3'-UTR, the relative luciferase activity of the miR-520e-inhibitor group was reduced which compared with NC-mimic ($P<0.001$). Compared with the control group, the levels of AEG-1 mRNA and protein expression in the miR-520e-mimic group were reduced, while those in the

* 基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2018JM7118)

作者简介:吕飒美(1973-),女,副主任医师,主要研究方向:消化及营养代谢性疾病,E-mail: wuyouwei0906@163.com,电话:15829219999

[△] 通讯作者:易默(1979-),女,副主任医师,主要研究方向:消化及营养代谢性疾病,E-mail: 124375121@qq.com,电话:13720761885

(收稿日期:2021-03-03 接受日期:2021-03-26)

miR-520e-inhibitor group were increased ($P<0.001$). Compared with the miR-520e-mimic+NC-pcDNA3.1 group, the expression levels of AEG-1 mRNA and protein in miR-520e-mimic+AEG-1-pcDNA3.1 group increased, the OD_{490nm} value increased, the apoptosis rate decreased, the number of migrating and invasive cells increased, the protein expression levels of MMP2 and MMP9, as well as the phosphorylation level of p65 increased ($P<0.001$). **Conclusion:** The expression of miR-520e is reduced in colorectal cancer, miR-520e exerts anti-colorectal cancer properties by targeting AEG-1, and its anti-cancer mechanism may be mediated by NF- κ B signaling pathway.

Key words: Colorectal cancer; MicroRNA-520e; Astrocyte elevated gene-1; Invasion; NF- κ B signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.3 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2022)17-3229-09

前言

近年来,结直肠癌(Colorectal cancer,CRC)的发病率明显上升,大多数癌症患者的死亡与癌症转移有关,这涉及到与遗传和环境因素相关的多个非编码基因,以及编码基因表达失调与信号通路异常^[1-3]。microRNAs(miRNAs)参与多种生理和病理过程,如发育、分化、增殖、新陈代谢和肿瘤发生^[4-7]。miRNAs已成为癌症诊断和治疗的重要生物标志物,其几乎在所有人类恶性肿瘤表达中失调^[8]。据报道,miR-520e在肝癌、乳腺癌和肺癌中发挥抑癌功能^[9-13]。但其在结直肠癌中的功能和作用尚未有报道。前期研究表明,miR-520e在结直肠癌患者的肿瘤组织和结直肠癌细胞系中低表达,生物信息学软件预测了miR-520e的靶标分子,发现致癌基因星形胶质细胞上调基因-1(Astrocyte elevated gene-1,AEG-1)^[14-16]的mRNA 3'-UTR富含miR-520e的结合位点,提示AEG-1可能是520e的下游靶基因。基于此,本文旨在探讨miR-520e靶向AEG-1调控结直肠癌细胞的生物学功能和作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂 ELX-808酶标仪(美国BioTek);CyFlow Cube6流式细胞仪(德国Sysmex Partec);DMEM培养基(美国Thermo Fisher Science);Lipofectamine 2000试剂(美国Invitgen);MTT试剂(北京索莱宝科技有限公司);Annexin V-FITC/PI双染色试剂盒(美国BD Pharmingen公司);Transwell(美国Corning);Matrigel基质胶(美国Becton Dickinson);双荧光素酶报告系统(美国Promega);TRIzol试剂(美国Invitrogen);One Step PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit和PrimeScript RT Master Mix Kit(日本TaKaRa);Universal SYBR Green Master Mix(瑞士Roche);RIPA试剂(碧云天生物技术研究);PVDF膜(美国Invitgen)。一抗及二抗(英国Abcam)。

1.1.2 标本收集 2018年1月至2018年12月收集47例经陕西省人民医院病理科医生诊断证实的结直肠癌患者的癌组织和距结直肠癌病灶>10 cm的正常癌旁组织,-80℃冰箱保存。收集组织时患者均未经放化疗、靶向治疗等治疗。患者包括男性27例,女性20例,年龄为35-78岁,平均 57.12 ± 14.34 岁。本研究已通过陕西省人民医院伦理委员会的批准,参与本研究的患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 结直肠癌细胞系SW480和正常结肠粘膜上

皮细胞系NCM460购自美国ATCC。细胞在含10%胎牛血清(FBS)、100 μ g/mL链霉素和100 U/mL青霉素的DMEM培养基中于37℃、5% CO₂的培养箱中培养。

1.2.2 细胞分组和转染 miR-520e-mimic、阴性对照mimic(NC-mimic)、miR-520e-inhibitor、阴性对照inhibitor(NC-inhibitor)、AEG-1的过表达pcDNA3.1载体(AEG-1-pcDNA3.1)和阴性对照pcDNA3.1载体(NC-pcDNA3.1)均由上海吉玛制药技术有限公司合成。后续实验中,根据检测目的和方法将细胞进行如下分组:对照组、miR-520e-mimic组、NC-mimic组、miR-520e-inhibitor组、NC-inhibitor组、miR-520e-mimic+AEG-1-pcDNA3.1组和miR-520e-mimic+NC-pcDNA3.1组。采用Lipofectamine 2000试剂对SW480细胞进行转染,转染48 h后,采用qRT-PCR方法检测miR-520e和AEG-1 mRNA表达水平。

1.2.3 细胞增殖测定 SW480细胞经转染48 h后,通过MTT法检测SW480细胞的增殖,细胞接种于96孔板(5×10^3 个/孔),37℃培养48 h,10 μ L MTT试剂与细胞混合,37℃培养4 h,使用ELX-808酶标仪检测490 nm处的吸光度(OD_{490nm})。实验设置6个重复。

1.2.4 细胞凋亡测定 SW480细胞经转染48 h后,通过Annexin V-FITC/PI双染色试剂盒检测细胞凋亡情况。将转染后的细胞室温下离心5 min,用预冷的PBS重新悬浮细胞,然后离心5~10 min。洗涤后,加入300 μ L 1 $\times$ 结合缓冲液重新悬浮细胞。然后加入5 μ L Annexin V-FITC,室温避光孵育15 min。加入5 μ L PI,冰上避光孵育5 min。使用CyFlow Cube6流式细胞仪在480和530 nm处检测FITC荧光,在575 nm以上的激发波长检测PI。实验设置6个重复。

1.2.5 细胞迁移和侵袭测定 SW480细胞经转染48 h后,通过Transwell检测细胞迁移和侵袭,各组细胞消化后用无血清DMEM重新悬浮。计数细胞数,稀释至 3×10^5 个/mL。上室加入100 μ L细胞悬液,下室加入600 μ L含有10%胎牛血清的DMEM培养基,37℃培养24 h。擦掉未迁移的细胞,PBS洗涤,甲醇固定,0.1%的结晶紫染色,显微镜观察并拍照和计数。侵袭实验中,上室铺一层Matrigel基质胶。Matrigel用预冷的无血清DMEM按10:1的比例稀释并混合。每个上室底部涂沫100 μ L稀释的Matrigel,室温放置2 h,用200 μ L无血清培养基冲洗。实验设置6个重复。

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验 委托上海吉玛制药技术有限公司构建野生型(WT-AEG-1-3'-UTR)和突变型(MT-AEG-1-3'-UTR)报告基因载体。采用Lipofectamine 2000

试剂将 WT-AEG-1-3'-UTR 或 MT-AEG-1-3'-UTR 报告基因载体和 miR-520e-mimic 或 NC-mimic 共转染至 SW480 细胞中, 孵育 48 h 后, 收集并裂解细胞, 采用双荧光素酶报告系统检测荧光素酶活性。实验设置 6 个重复。

1.2.7 qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平 使用 TRIzol 试剂从 SW480 细胞或组织中分离总 RNA。使用 One Step PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit 和 PrimeScript RT Master Mix Kit 进行 miRNA 和 mRNA 的逆转录。使用 Universal SYBR Green Master Mix 和 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 进行 qRT-PCR。U6 用作 miR-520e 表达的内部对照, 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)用作 AEG-1 mRNA 表达的内部对照。引物序列如下: miR-520e: 正向, 5'-GACGGTAAAGGTGCAGCCAG-3', 反向, 5'-TGTCCGCCTGAAAAATGCGAC-3'; U6: 正向, 5'-AAAGCAAATCATCGGACGACC-3', 反向, 5'-GTACAA-CACATTGTTTCCTCGGA-3'; AEG-1: 正向, 5'-CGAGAAGCCCAAACCAAATG-3', 反向 5'-TGGTGGCTGCTTTGCTGTT-3'; GAPDH: 正向, 5'-TGTGGGCATCAATGGATTG-3', 反向, 5'-ACACCATGTATTCCGGGTCAAT-3'。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法确定基因相对表达量。实验设置 6 个重复。

1.2.8 Western blotting 检测蛋白表达水平 用冰 RIPA 试剂裂解 SW480 细胞或组织, 用 BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白质浓

度。取等量的蛋白质进行 10% SDS-PAGE 电泳分离, 然后电转移到 PVDF 膜。随后, 将膜转移到添加 5% 的脱脂牛奶的 TBST 缓冲液中, 室温下孵育 1 h。随后将膜与以下一抗在 4℃ 孵育过夜: AEG-1 (1:5000 稀释)、基质金属蛋白酶 2(MMP2, 1:3000 稀释)、MMP9 (1:3000 稀释)、p65 (1:2000 稀释)、p-p65 (1:2000 稀释) 和 GAPDH (1:3000 稀释)。第二天, 室温下将膜与 HRP 标记的 IgG 二抗 (1:3000 稀释) 孵育 1 h。ECL 试剂显色。GAPDH 作为内参。采用 Image J 软件对蛋白质条带密度进行分析。实验设置 6 个重复。

1.3 统计分析

本研究采用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析, 测量数据用均数±标准差表示。两组间比较采用 t 检验或配对 t 检验, 多组比较采用单因素方差分析及 LSD 检验。P<0.05 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌组织和细胞中 miR-520e 的表达

与癌旁组织相比, 结直肠癌组织中 miR-520e 的表达水平降低 ($t=9.353$, $P<0.001$, 图 1A); 与 NCM460 细胞相比, SW480 细胞中 miR-520e 的表达水平降低 ($t=42.527$, $P<0.001$, 图 1B)。

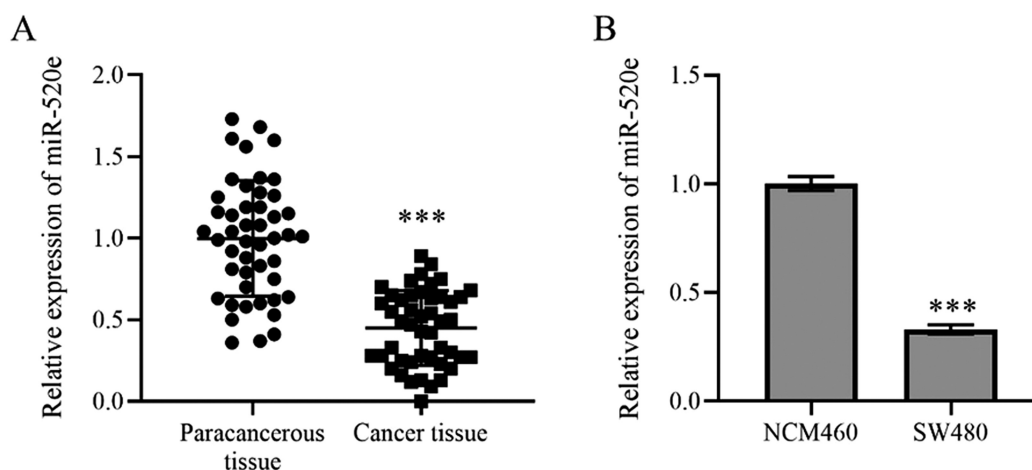


图 1 结直肠癌组织和细胞中 miR-520e 的表达

Fig.1 The expression of miR-520e in colorectal cancer tissues and cells

Note: A: The expression level of miR-520e in colorectal cancer tissues and adjacent tissues; *** $P<0.001$ compared with adjacent tissues;

B: The expression level of miR-520e in NCM460 cells and SW480 cells; compared with NCM460 cells, *** $P<0.001$.

2.2 miR-520e 对结直肠癌细胞增殖的影响

与对照组相比, miR-520e-mimic 组 miR-520e 的表达水平升高, miR-520e-inhibitor 组 miR-520e 的表达水平降低 ($P<0.001$)。MTT 实验显示, 与对照组 (0.53 ± 0.03) 相比, miR-520e-mimic 组的 OD_{490nm} 值 (0.39 ± 0.04) 降低, 而 miR-520e-inhibitor 组的 OD_{490nm} 值 (0.74 ± 0.04) 升高 ($P<0.001$)。见图 2。

2.3 miR-520e 对结直肠癌细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 双染色实验显示 (图 3), 与对照组 ($7.72\pm0.64\%$) 相比, miR-520e-mimic 组 ($18.64\pm1.80\%$) 的细胞凋亡率升高, miR-520e-inhibitor 组 ($3.08\pm0.37\%$) 的细胞凋亡率降低 ($P<0.001$)。

2.4 miR-520e 对结直肠癌细胞迁移和侵袭的影响

Transwell 实验显示, 与对照组 (50.85 ± 5.08) 相比, miR-520e-mimic 组 (16.66 ± 1.60) 的细胞迁移数量降低, miR-520e-inhibitor 组 (74.63 ± 9.11) 升高 ($P<0.001$, 图 4A)。与对照组 (36.32 ± 2.00) 相比, miR-520e-mimic 组 (15.23 ± 1.95) 的细胞侵袭数量降低, miR-520e-inhibitor 组 (53.52 ± 1.53) 升高 ($P<0.001$, 图 4B)。与对照组相比, miR-520e-mimic 组的 MMP2 和 MMP9 蛋白表达水平均降低, miR-520e-inhibitor 组的 MMP2 和 MMP9 蛋白表达水平均升高 ($P<0.001$, 图 5)。

2.5 miR-520e 对结直肠癌细胞 NF- κ B 信号通路的影响

与对照组相比, miR-520e-mimic 组的 p-p65 蛋白表达水平

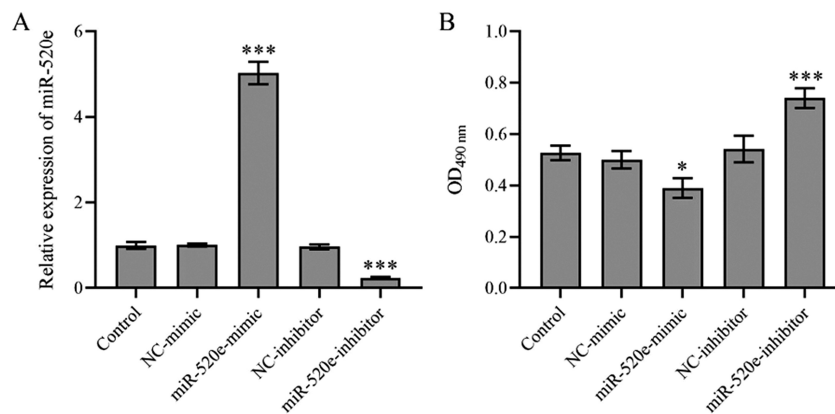


图2 miR-520e 对 SW480 细胞增殖的影响

Fig.2 The effect of miR-520e on the proliferation of SW480 cells

Note: A: The expression level of miR-520e after transfection of SW480 cells; B: The OD_{490nm} value of each group of cells detected by MTT method; Compared with control, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

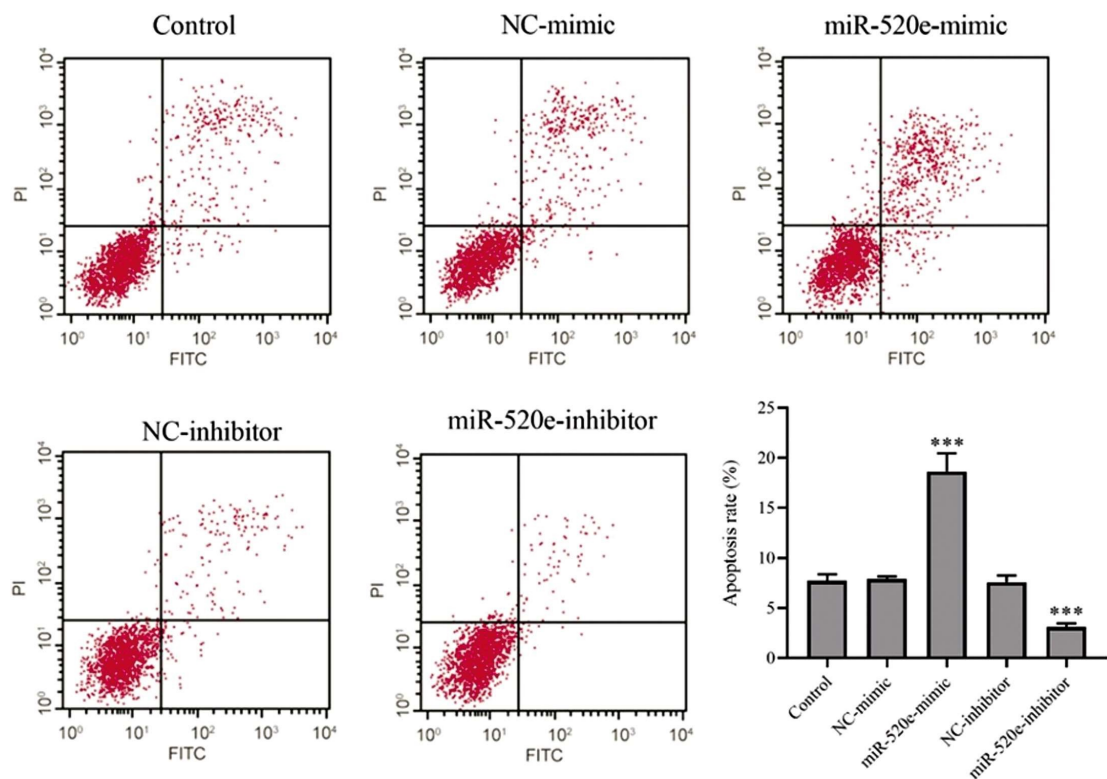


图3 Annexin V- FITC/PI 双染法检测 miR-520e 对 SW480 细胞凋亡的影响

Fig.3 Annexin V-FITC/PI double staining method detected the effect of miR-520e on SW480 cell apoptosis

Note: Compared with control, *** $P < 0.001$.

降低, miR-520e-inhibitor 组升高($P < 0.001$)。然而各组 p65 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 6。

2.6 miR-520e 靶向 AEG-1 并通过 NF- κ B 信号通路调节结直肠癌细胞的增殖、凋亡和侵袭

microRNA.org-Targets and Expression 和 TargetScan 软件预测了 AEG-1(MTDH)和 miR-520e 存在靶向关系(图 7A)。双荧光素酶报告基因实验显示(图 7B),与 WT-AEG-1-3'-UTR 共转染后,与 NC-mimic 相比,miR-520e-inhibitor 组的相对荧光素酶活性降低($P < 0.001$)。与癌旁组织或 NCM460 细胞相比,癌组织和 SW480 细胞中 AEG-1 的 mRNA 和蛋白表达水平均上调($P < 0.001$, 图 7C-E)。与对照组相比,miR-520e-mimic 组的

AEG-1 mRNA 和蛋白表达水平均降低, miR-520e-inhibitor 组均升高($P < 0.001$, 图 7F-G)。

对转染 miR-520e-mimic 的细胞共转染 NC-pcDNA3.1 或 AEG-1-pcDNA3.1,与 miR-520e-mimic+NC-pcDNA3.1 组相比,miR-520e-mimic+AEG-1-pcDNA3.1 组的 AEG-1 的 mRNA 和蛋白表达水平升高(图 8A 和 B),OD_{490nm} 值升高(图 8C),细胞凋亡率降低(图 8D),迁移和侵袭细胞数增加(图 9),MMP2 和 MMP9 的蛋白表达水平(图 9)及 p65 的磷酸化水平均升高($P < 0.001$, 图 10)。

3 讨论

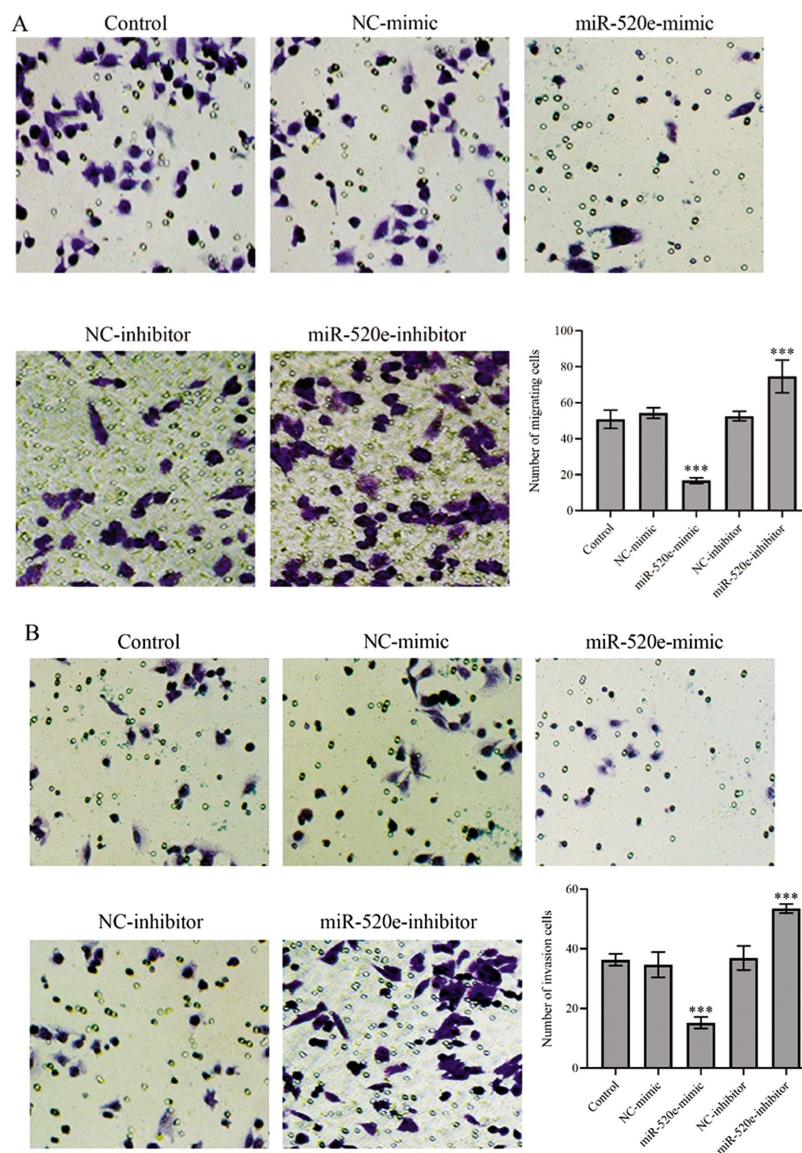


图 4 Transwell 检测 miR-520e 对 SW480 细胞迁移和侵袭的影响

Fig.4 Transwell detected the effect of miR-520e on the migration and invasion of SW480 cells

Note: A: Cell migration experiment (200x); B: Cell invasion experiment (200x); Compared with control, *** $P < 0.001$.

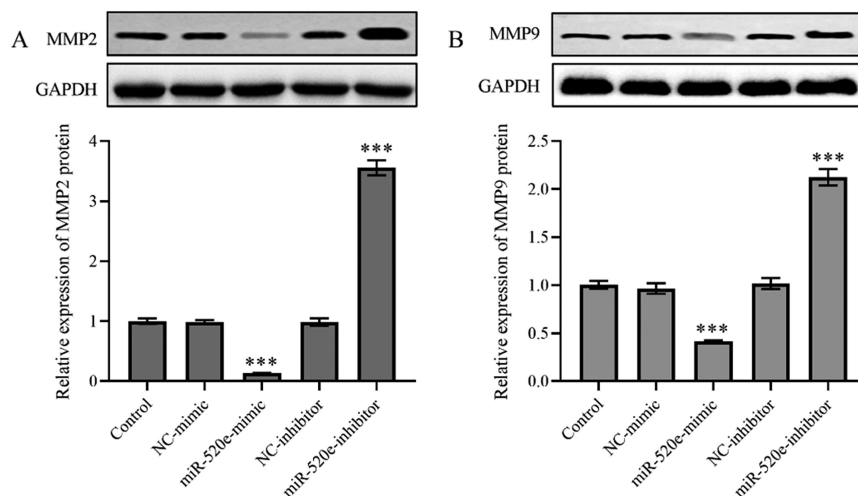


图 5 Western blotting 检测 miR-520e 对 SW480 细胞 MMP2 和 MMP9 蛋白表达的影响

Fig.5 Western blotting detected the effect of miR-520e on the protein expression of MMP2 and MMP9 in SW480 cells

(A and B: The relative expression of MMP2 and MMP9 protein).

Note: Compared with control, *** $P < 0.001$.

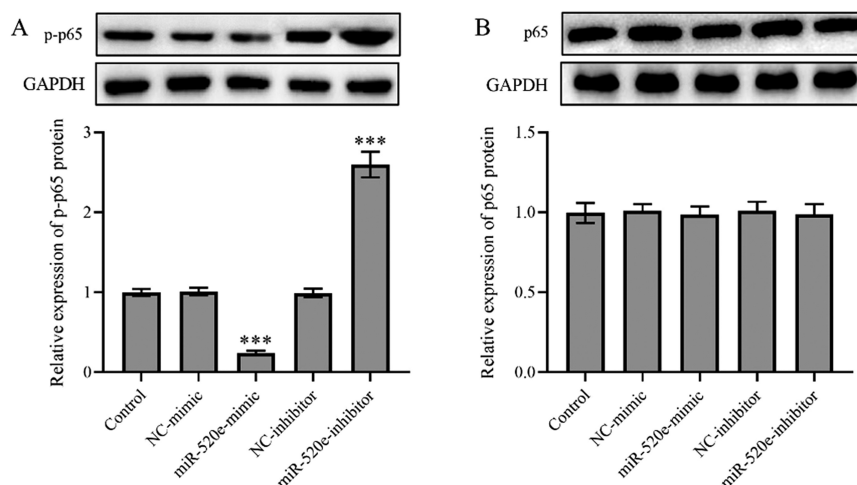


图 6 Western blotting 检测 miR-520e 对 SW480 细胞 NF- κ B p65 活化的影响

Fig.6 Western blotting detected the effect of miR-520e on the activation of NF- κ B p65 in SW480 cells

(A and B: relative expression of p-p65 and p65 protein)

Note: Compared with control, *** $P<0.001$.

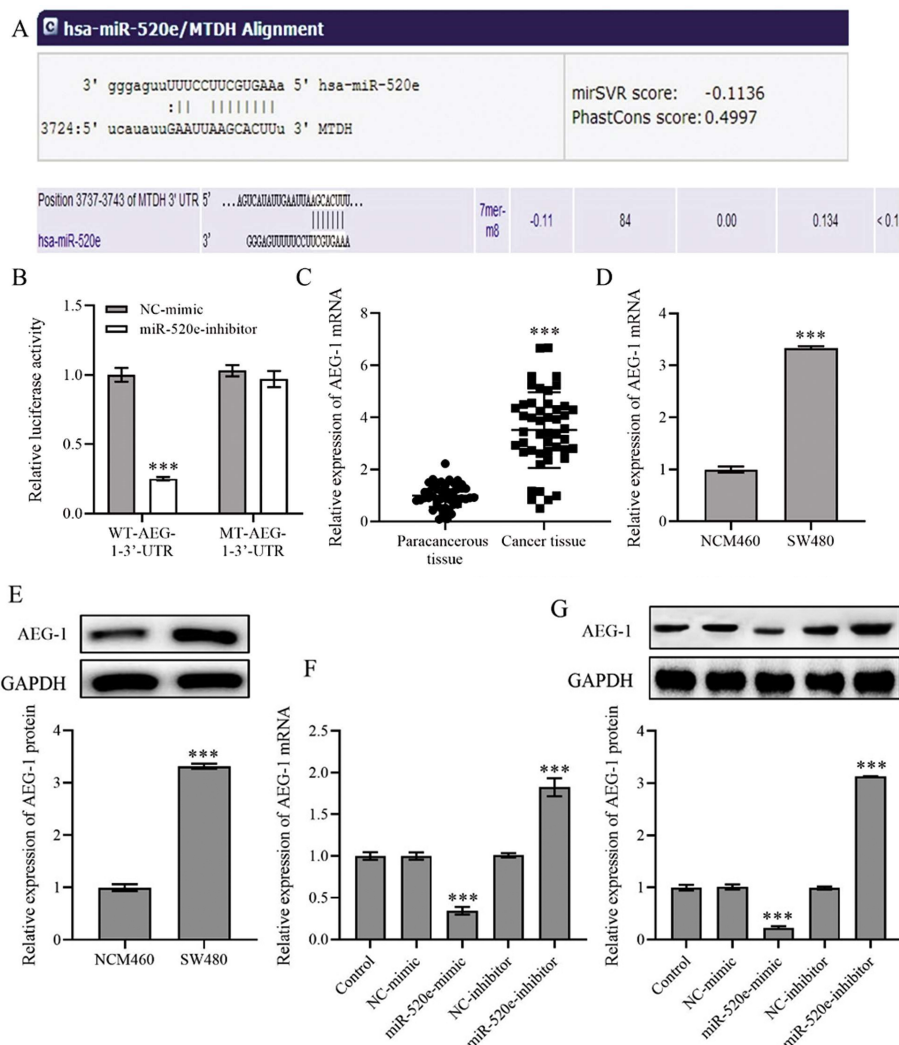


图 7 AEG-1 在结直肠癌组织和细胞中高表达并作为 miR-520e 的靶标

Fig.7 AEG-1 was highly expressed in colorectal cancer tissues and cells and serves as a target of miR-520e

Note: A: microRNA.org-Targets and Expression and TargetScan predicted the predicted binding sequence of AEG-1 (MTDH) 3'-UTR and miR-520e;

B: dual luciferase reporter gene experiment, compared with NC-mimic, *** $P<0.001$; C-E: the expression of AEG-1 in colorectal cancer tissues and cells, compared with paracancerous tissues or NCM460 cells, *** $P<0.001$;

F and G: the effect of miR-520e on the expression of AEG-1 mRNA and protein, compared with Control, *** $P<0.001$.

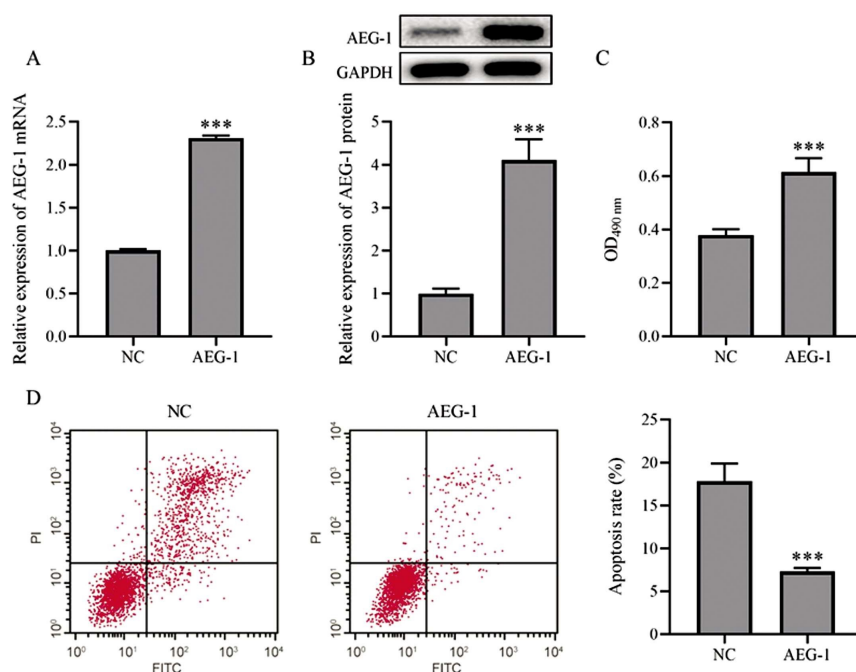


图 8 miR-520e 靶向 AEG-1 调节 SW480 细胞的增殖和凋亡

Fig.8 miR-520e targeted AEG-1 to regulate the proliferation and apoptosis of SW480 cells

Note: NC: miR-520e-mimic+NC-pcDNA3.1 group, AEG-1: miR-520e-mimic+AEG-1-pcDNA3.1 group; A and B: Transfection of AEG-1-pcDNA3.1 up-regulated the mRNA and protein expression of AEG-1, respectively; C: OD_{490nm} value; D: Apoptosis rate; compared with miR-520e-mimic+NC-pcDNA3.1, *** $P<0.001$.

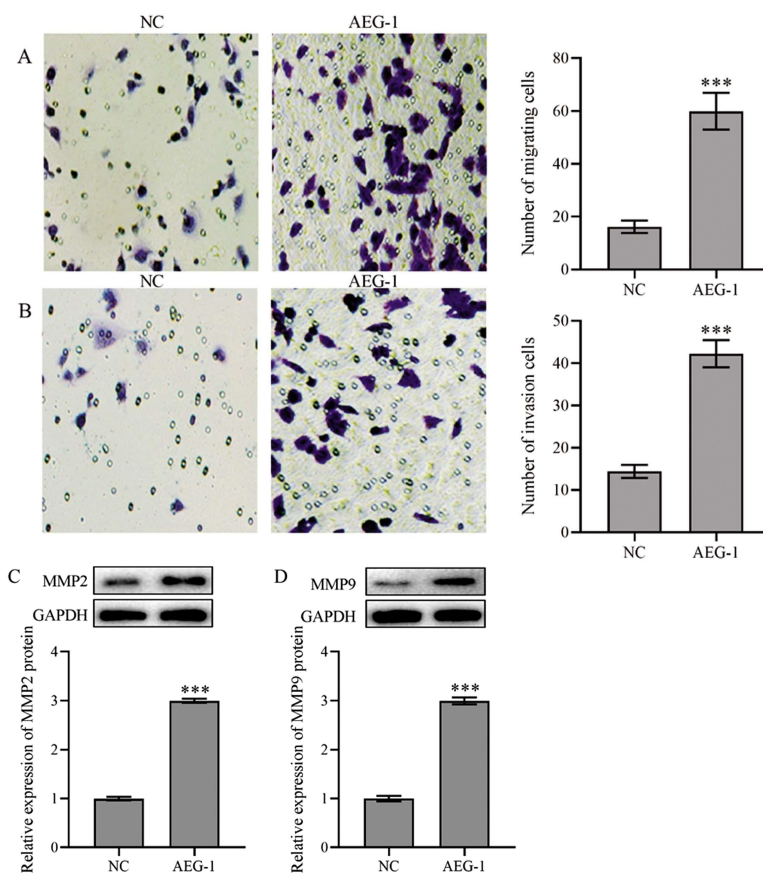


图 9 miR-520e 靶向 AEG-1 调节 SW480 细胞的迁移和侵袭

Fig.9 miR-520e targeted AEG-1 to regulate the migration and invasion of SW480 cells

Note: NC: miR-520e-mimic+NC-pcDNA3.1 group, AEG-1: miR-520e-mimic+AEG-1-pcDNA3.1 group; A and B: Cell migration and invasion experiment results (200 $\times$), respectively; C and D: Relative protein expression of MMP2 and MMP9, respectively; Compared with miR-520e-mimic+NC-pcDNA3.1, *** $P<0.001$.

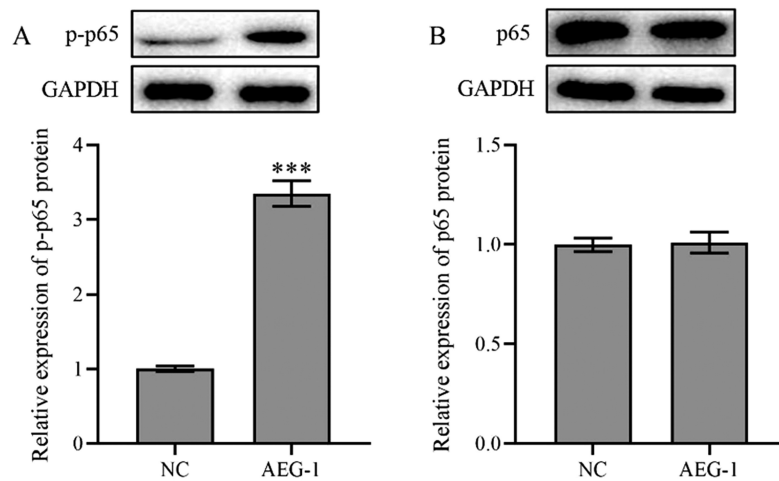


图 10 miR-520e 靶向 AEG-1 调节 SW480 细胞的 NF- κ B 信号通路

Fig.10 miR-520e targeted AEG-1 to regulate the NF- κ B signaling pathway of SW480 cells

Note: NC: miR-520e-mimic+NC-pcDNA3.1 group, AEG-1: miR-520e-mimic+AEG-1-pcDNA3.1 group;

A and B: relative protein expression of p-p65 and p65, respectively; Compared with miR-520e-mimic+NC-pcDNA3.1, *** $P < 0.001$.

目前,手术治疗仍然是结直肠癌患者的主要治疗选择,但结直肠癌患者的总体生存率仍然较低^[17-19]。因此,从基因变化的角度全面研究大肠癌的调控机制,将有助于提高大肠癌患者的治疗策略和生存率。miRNAs 通过与 mRNA 靶标结合促进或抑制其翻译,从而发挥其调节功能。近年来,多项研究报道了 miR-520e 对肿瘤的发生和进展的影响。例如,miR-520e 在乳腺癌细胞系中低表达,过表达 miR-520e 会增加乳腺癌细胞对补体依赖性细胞毒性(CDC)的敏感性^[20]。另有报道,miR-520e 在乳腺癌患者的肿瘤组织中低表达,过表达 miR-520e 可以抑制乳腺癌细胞的生长和迁移^[9]。Zhang 等报道,miR-520e 在肝癌细胞患者肿瘤组织和细胞系中表达显著降低,miR-520e 可以通过靶向调控 NF- κ B 诱导激酶来抑制肝癌细胞的增殖^[10]。过表达 miR-520e 可以抑制非小细胞肺癌的生长,其机制可能与靶向调控 Zbtb7a 基因有关^[21]。本文研究表明,miR-520e 在结直肠癌组织和细胞系中表达降低,上调 miR-520e 可抑制结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭,并抑制癌细胞转移相关蛋白 MMP2 和 MMP9 的表达,并促进凋亡。然而,下调 miR-520e 则促进了结直肠癌细胞的恶性行为。以上结果充分说明 miR-520e 对多种癌细胞具有抑癌功能,可能是重要的结直肠癌诊断和治疗的靶标。

此外,本文结果还表明 miR-520e 对 NF- κ B 的活性具有抑制作用。NF- κ B 是一种众所周知的转录因子,通过保护肿瘤免受凋亡^[22]以及通过 ABC 转运蛋白 P-gp 和 MRP2 诱导多药耐药发挥促进肿瘤生长的作用^[23]。因此,miR-520e 的抑癌功能可能也是通过 NF- κ B 信号通路介导的。

AEG-1 也称为异粘蛋白 (Metadherin, MTDH), 人类 AEG-1 基因位于常染色体 8q22.1 上, 此位点是许多恶性肿瘤的高发相关地带^[24]。AEG-1 在多种恶性肿瘤中高表达,被认为是肿瘤治疗的一个潜在的靶标分子^[25-27]。AEG-1 可以激活多个致癌信号转导通路,包括 PI3K/Akt、NF- κ B、MAPK 和 Wnt 等^[14]。本文研究表明,AEG-1 在结直肠癌组织和细胞系中表达升高。也有报道表明,AEG-1 在结直肠癌患者肿瘤组织中高表达,并且与肿瘤分期和患者的低存活率密切相关^[28]。敲除 AEG-1 可以显著抑制结肠癌细胞的生长和转移,而过表达 AEG-1 则显

著促进结直肠癌细胞的生长和转移^[29]。Song 等报道 AEG-1 通过激活 MMP-9 的表达促进结直肠癌细胞的侵袭能力^[30]。这些研究表明,AEG-1 在结直肠癌的发生和进展中具有重要的作用。本文通过生物信息学软件预测了 AEG-1 是 miR-520e 的潜在靶标。进一步的双荧光素酶报告基因检测证实了 miR-520e 靶向抑制 AEG-1, 并且通过上调 AEG-1 的表达可逆转 miR-520e 过表达对结直肠癌细胞的抗癌特性。由于 AEG-1 可以激活 NF- κ B 信号通路^[14],本研究也发现 AEG-1 的上调逆转了 miR-520e 对 NF- κ B 信号通路的抑制作用。这些结果提示,miR-520e 可能通过 AEG-1 介导的 NF- κ B 信号通路来发挥抗结直肠癌的作用。

综上所述,miR-520e 在结直肠癌中表达降低,可通过靶向抑制 AEG-1 来发挥抗结直肠癌特性,其抗癌机制可能通过 NF- κ B 信号通路介导。总之,miR-520e 和 AEG-1 具有成为结直肠癌早期诊断、临床治疗和药物研发的新型分子靶标。

参考文献(References)

- [1] Baidoun F, Elshiw Y, Elkerai Y, et al. Colorectal cancer epidemiology: recent trends and impact on outcomes [J]. *Curr Drug Targets*, 2021, 22(9): 998-1009
- [2] Siegel RL, Jakubowski CD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer in the young: epidemiology, prevention, management [J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2020, 40: 1-14
- [3] The Lancet Gastroenterology H. Colorectal cancer screening: is earlier better?[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2018, 3(8): 519
- [4] Saliminejad K, Khorram HR, Soleymani S, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451-5465
- [5] Adil MS, Khulood D, Somanath PR. Targeting Akt-associated microRNAs for cancer therapeutics [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 189: 114384
- [6] Fridrichova I, Zmetakova I. MicroRNAs contribute to breast cancer invasiveness[J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1361
- [7] Jing Y, Liang W, Liu J, et al. Autophagy-mediating microRNAs in cancer chemoresistance[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2020, 36(6): 517-536

- [8] Ali Syeda Z, Langden SSS, Munkhzul C, et al. Regulatory mechanism of MicroRNA expression in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1723
- [9] Yi M, Li M, Long X, et al. miR-520e regulates cell proliferation, apoptosis and migration in breast cancer [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 3543-3548
- [10] Zhang S, Shan C, Kong G, et al. MicroRNA-520e suppresses growth of hepatoma cells by targeting the NF- κ B-inducing kinase (NIK)[J]. *Oncogene*, 2012, 31(31): 3607-3620
- [11] Kucuksayan H, Akgun S, Ozes ON, et al. TGF- β -SMAD-miR-520e axis regulates NSCLC metastasis through a TGFBR2-mediated negative-feedback loop[J]. *Carcinogenesis*, 2019, 40(5): 695-705
- [12] Liang Q, Yao Q, Hu G. CyclinD1 is a new target gene of tumor suppressor MiR-520e in breast cancer [J]. *Open Med (Wars)*, 2019, 14: 913-919
- [13] Tian JH, Liu WD, Zhang ZY, et al. Influence of miR-520e-mediated MAPK signalling pathway on HBV replication and regulation of hepatocellular carcinoma cells via targeting EphA2[J]. *J Viral Hepat*, 2019, 26(4): 496-505
- [14] Hu G, Wei Y, Kang Y. The multifaceted role of MTDH/AEG-1 in cancer progression[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(18): 5615-5620
- [15] Sarkar D. AEG-1/MTDH/LYRIC in liver cancer[J]. *Adv Cancer Res*, 2013, 120: 193-221
- [16] Sarkar D, Fisher PB. AEG-1/MTDH/LYRIC: clinical significance[J]. *Adv Cancer Res*, 2013, 120: 39-74
- [17] La Vecchia S, Sebastián C. Metabolic pathways regulating colorectal cancer initiation and progression [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 98: 63-70
- [18] Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo AG, et al. Early-onset colorectal cancer in young individuals[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(2): 109-131
- [19] Piawah S, Venook AP. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer[J]. *Cancer*, 2019, 125(23): 4139-4147
- [20] Cui W, Zhang Y, Hu N, et al. miRNA-520b and miR-520e sensitize breast cancer cells to complement attack via directly targeting 3'UTR of CD46[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(3): 232-241
- [21] Zhijun Z, Jingkang H. MicroRNA-520e suppresses non-small-cell lung cancer cell growth by targeting Zbtb7a-mediated Wnt signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(1): 49-56
- [22] Wu M, Lee H, Bellas RE, et al. Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells[J]. *Embo J*, 1996, 15(17): 4682-4690
- [23] Zhuang X, Li X, Zhang J, et al. Conditioned medium mimicking the tumor microenvironment augments chemotherapeutic resistance via ataxia?telangiectasia mutated and nuclear factor- κ B pathways in gastric cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(4): 2334-2342
- [24] Anttila V, Stefansson H, Kallela M, et al. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(10): 869-873
- [25] Khan M, Sarkar D. The scope of astrocyte elevated gene-1/metadherin (AEG-1/MTDH) in cancer clinicopathology: a review[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(2): 308
- [26] Malayaperumal S, Sriramulu S, Jothimani G, et al. A Review of AEG-1 oncogene regulating MicroRNA expression in colon cancer progression[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2021, 21(1): 27-34
- [27] Wu S, Zhang Z, Wu D, et al. AEG-1 promotes the growth of gastric cancer through the upregulation of eIF4E expression[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 5887-5895
- [28] Song H, Li C, Li R, et al. Prognostic significance of AEG-1 expression in colorectal carcinoma [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2010, 25(10): 1201-1209
- [29] Gnosa S, Capodanno A, Murthy RV, et al. AEG-1 knockdown in colon cancer cell lines inhibits radiation-enhanced migration and invasion in vitro and in a novel in vivo zebrafish model [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49): 81634-81644
- [30] Song H, Tian Z, Qin Y, et al. Astrocyte elevated gene-1 activates MMP9 to increase invasiveness of colorectal cancer[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(7): 6679-6685