

miRNA-140-5p 调控 FoxM1 抑制结直肠癌 SW480 细胞增殖、迁移及侵袭

王远鹏^{1*}, 陈毅敏², 褚亮¹, 康壮壮¹, 马家驰²

¹蚌埠医科大学第二附属医院普外科 安徽蚌埠

²蚌埠医科大学第一附属医院肿瘤外科 安徽蚌埠

【摘要】目的 探讨 miRNA-140-5p 通过靶向调控 FoxM1 影响 SW480 细胞增殖、侵袭及迁移等生物学行为。**方法** 应用双荧光素酶报告基因系统鉴定对 miR-140-5p 和 FoxM1 的靶向匹配关系。CCK8 检测 FoxM1 基因表达对细胞增殖的影响, 以及 miR-140-5p 对 FoxM1 表达的调控作用。采用细胞集落形成实验检测 FoxM1 对细胞生长的影响, Western blotting 检测 FoxM1 蛋白的表达, Transwell 实验观察 FoxM1 对 SW480 细胞外的侵袭能力。**结果** 双荧光素酶报告基因系统鉴定表明 miR-140-5p 在转录后有效调控 FoxM1 的表达, CCK8 检测表明 FoxM1 基因高表达可促进癌细胞的增殖, 细胞集落形成实验检测结果表明 FoxM1 基因高表达能够增加 SW480 细胞的克隆能力, 细胞划痕实验结果表明 FoxM1 基因在结直肠癌 SW480 细胞的迁移能力中起着重要作用, miR-140-5p 抑制了细胞的迁移能力。**结论** miR-140-5p 可靶向调控 FoxM1, 敲低的 FoxM1 基因可抑制 SW480 细胞恶性化进程, miR-140-5p 可能通过靶向调控 FoxM1 并参与 SW480 细胞增殖、侵袭及迁移等生物学行为。

【关键词】 微小 RNA; 结直肠肿瘤; 增殖; 侵袭

【基金项目】 2021 年蚌埠医学院自然科学研究项目 (编号: 2021byzd189)

【收稿日期】 2024 年 10 月 16 日

【出刊日期】 2024 年 11 月 18 日

【DOI】 10.12208/j.ijcr.20240453

miRNA-140-5p inhibits the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer SW480 cells by regulating FoxM1

Yuanpeng Wang^{1*}, Yimin Chen², Liang Chu¹, Zhuangzhuang Kang¹, Jiachi Ma²

¹Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu, Anhui

²Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu, Anhui

【Abstract】 Objective To investigate the biological behaviors of SW480 cells such as proliferation, invasion and migration affected by miRNA-140-5p through targeted regulation of FoxM1. **Methods** The dual luciferase reporter gene system was used to identify the targeted matching relationship between miR-140-5p and FoxM1. CCK8 was used to detect the effect of FoxM1 gene expression on cell proliferation, and the regulatory effect of miR-140-5p on FoxM1 expression. The effect of FoxM1 on cell growth was detected by cell colony formation assay, the expression of FoxM1 protein was detected by Western blotting, and the invasion ability of FoxM1 on SW480 cells was observed by Transwell assay. **Results** Dual luciferase reporter gene system identification showed that miR-140-5p effectively regulated the expression of FoxM1 after transcription. CCK8 detection showed that high expression of FoxM1 gene could promote the proliferation of cancer cells. The results of cell colony formation assay showed that high expression of FoxM1 gene could increase the cloning ability of SW480 cells. The results of cell scratch assay showed that FoxM1 gene played an important role in the migration ability of colorectal cancer SW480 cells, and miR-140-5p inhibited the migration ability of cells. **Conclusion** miR-140-5p can target and regulate FoxM1. Knockdown of FoxM1 gene can inhibit the malignant process of SW480 cells. miR-140-5p may participate in the biological behaviors of SW480 cell proliferation, invasion and migration by targeting and regulating FoxM1.

【Keywords】 microRNA; Colorectal tumor; Proliferation; Invasion

*通讯作者: 王远鹏

结直肠癌 (Colorectal cancer, CRC) 是世界上常见的恶性肿瘤之一, 其发病率居男性恶性肿瘤第 3 位, 女性恶性肿瘤第 2 位, 其病死率在癌症相关死亡中居第 2 位^[1]。微小 RNA (micro-RNAs, mi-RNAs) 是一种内源性非编码 RNA, 可调控基因的转录与翻译, 发挥抑制或促进肿瘤细胞增殖的作用^[2]。

miR-140 参与了多种恶性肿瘤的发生与发展, 其中 miR-140 的 5p 成熟体被认为可通过调控内源性趋化因子受体 1 逆转结直肠癌对 5-Fu 的耐药^[3]。但目前 miR-140-5p 调控 CRC 细胞增殖、侵袭等生物学行为的具体机制尚未完全阐明。人叉头盒 M1 转录因子 (forkhead box Protein M1, FoxM1) 是一种特异性增殖转录调节蛋白, 在多种恶性肿瘤中呈高表达, 影响肿瘤的进展和预后^[4]。本研究观察 miR-140-5p 是否通过靶向调控 FoxM1 蛋白水平来影响 CRC 细胞增殖、侵袭等生物学行为。将为今后 CRC 新靶点治疗的选择提供实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人 CRC 细胞系 SW480 采购于 Cobioer 生物技术有限公司 (南京), 并在 DMEM 和胎牛血清中培养 (37°C, 5% CO₂), miR-140-5p 采购于吉凯基因化学技术有限公司 (上海)。

1.2 双荧光素酶报告基因系统鉴定

将处于对数生长期 SW480 细胞中的培养液弃去, 然后加入适量 PBS 缓冲液, 离心 (1200 rpm, 3 min), 再弃去上清液, 重复 2 次, 清洗收集至培养瓶中。加入一定量的 0.25% 胰蛋白酶消化液, 脱落壁上细胞, 转移至新培养瓶中, 加入 DMEM 培养基, 然后吹打细胞使细胞均匀悬浮于培养基中。采用台盼蓝 (Trypan Blue) 染液细胞活性染料进行定量检测细胞存活率。加入萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶反应液, 混匀后检测其活力。

1.3 Western blotting 检测 FoxM1 蛋白表达

用 siCon 或 siFoxM1 转染一组 SW480 细胞, 使用 WB 检测 FoxM1 的表达。再分别使用 miR-NC、miR-140-5p 转染另一组 SW480 细胞, 然后使用含有 FoxM1 共转染 SW480 细胞。采用 WB 检测 FoxM1 的表达。

1.4 统计学方法

采用 Graphpad Prism 7.0 软件处理数据和绘图。计量资料用均数±标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示, 两组间比较用独立 t 检验。两个变量之间线性相关采用 Pearson 相关系数。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-140-5p 与 FoxM1 的靶向关系

双荧光素酶报告结果显示: 与 miR-NC 组相比较, miR-140-5p 组转染 wt-FoxM1 表达载体的细胞荧光素酶的活性显著减少, 差异具有统计学意义 (P<0.01)。而与 miR-NC 组相比较, miR-140-5p 组转染 mut-FoxM1 表达载体的细胞荧光素酶的活性无明显变化 (P>0.05)。如图 1 所示。

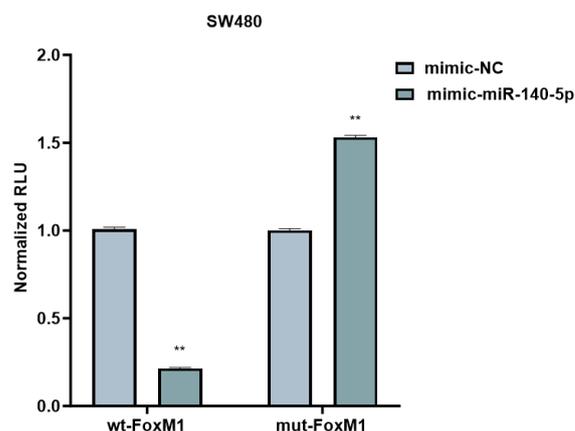


图 1 双荧光素酶报告结果

2.2 FoxM1 基因与沉默 FoxM1 基因的蛋白表达

WB 实验结果显示: 与 miR-NC 组相比, 转染 miR-140-5p 能够明显增加 SW480 细胞中 FoxM1 蛋白表达水平, 这与通常预期的 miRNA 下调目标蛋白的作用相反。这可能是因为 miR-140-5p 在特定条件下诱导了其其他信号通路, 导致 FoxM1 蛋白的表达增加。沉默 FoxM1 基因结果显示相对于对照组, 沉默 FoxM1 基因显著降低 FoxM1 蛋白的水平, 差异有显著意义 (P<0.01)。如图 2 所示。

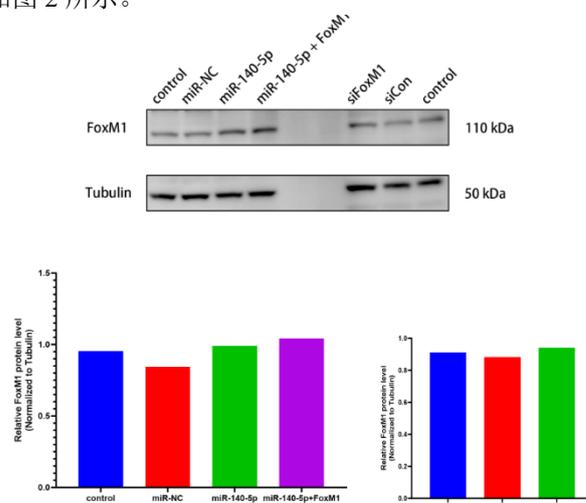


图 2 FoxM1 基因与沉默 FoxM1 基因的蛋白表达

2.3 FoxM1 基因表达对细胞增殖影响

分别将转染不同样品的 SW480 细胞接种于 96 孔板, 培养 1 d、2 d、3 d、4 d 后, 在 570 nm 波长检测其 OD 值, 结果显示: 与 NC 组比较, siFoxM1 组在 2 d、3 d、4 d 时间节点上 SW480 细胞增殖活性均显著下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。如图 3 所示。

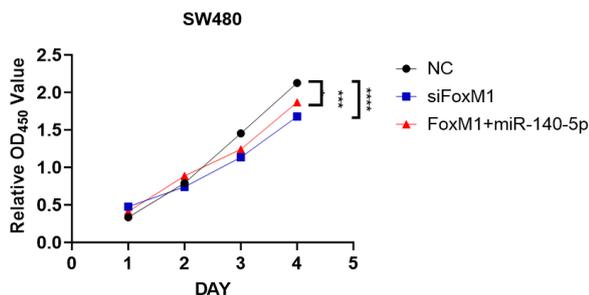


图 3 SW480 细胞增殖的吸光度值曲线图

2.4 FoxM1 对 SW480 细胞生长的影响

细胞集落形成实验结果显示: 在 SW480 细胞中, 与 Control 组比较, siFoxM1 组细胞克隆形成数量均明

显减少, 集落形成数差异有显著意义 ($P < 0.01$)。这意味着 FoxM1 的过表达, 即使是在 miR-140-5p 的存在下, 也显著增强了 SW480 细胞的克隆形成能力。如图 4 所示。

2.5 FoxM1 对 SW480 细胞迁移的影响

结果显示: 划痕 24h 后观察, 与 siFoxM1 组相比较, FoxM1+miR-140-5p 组仅有少许细胞迁移到划痕口, 其划痕口清晰可见, 表明该组 SW480 细胞迁移能力明显下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), FoxM1 高表达可明显抑制 SW480 细胞迁移。

3 讨论

在结直肠癌 (CRC) 的研究中, miR-140-5p 和 FoxM1 都受到了广泛关注, 它们在肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭中扮演着重要的角色。miR-140-5p 在结直肠癌中的表达水平较低, 并且其过表达可以促进结直肠癌细胞对化疗药物奥沙利铂的敏感性, 这可能与其对自噬的调控有关^[5]。有学者研究, miR-140-5p 能够通过靶向 ADAMTS5 和 IGFBP5 来抑制结直肠癌的侵袭和转移^[6]。

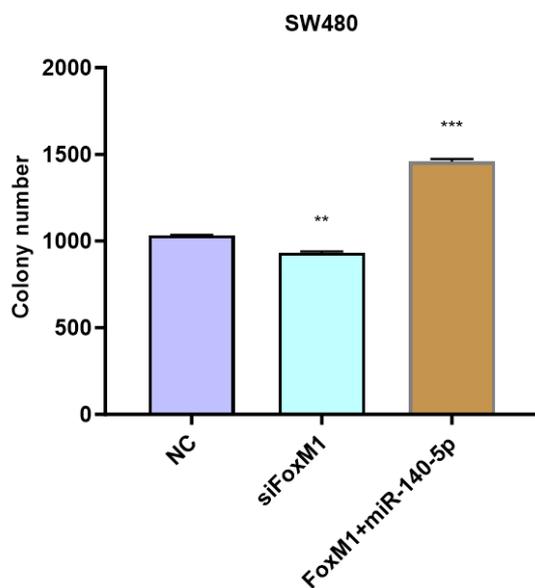
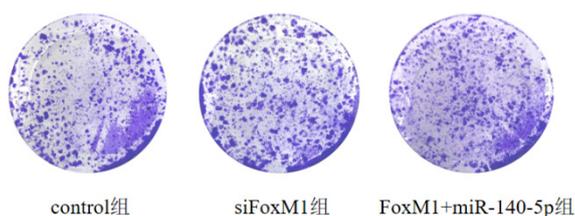


图 4 FoxM1 对 SW480 细胞生长的影响

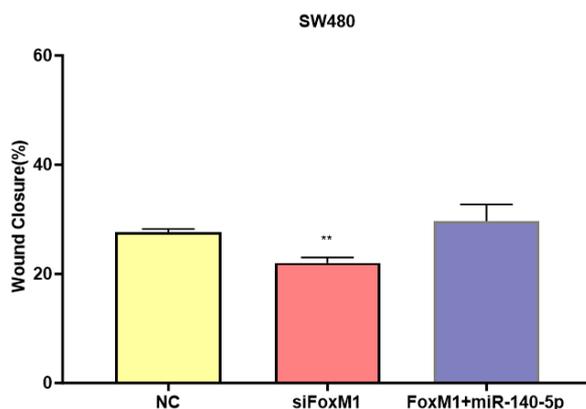
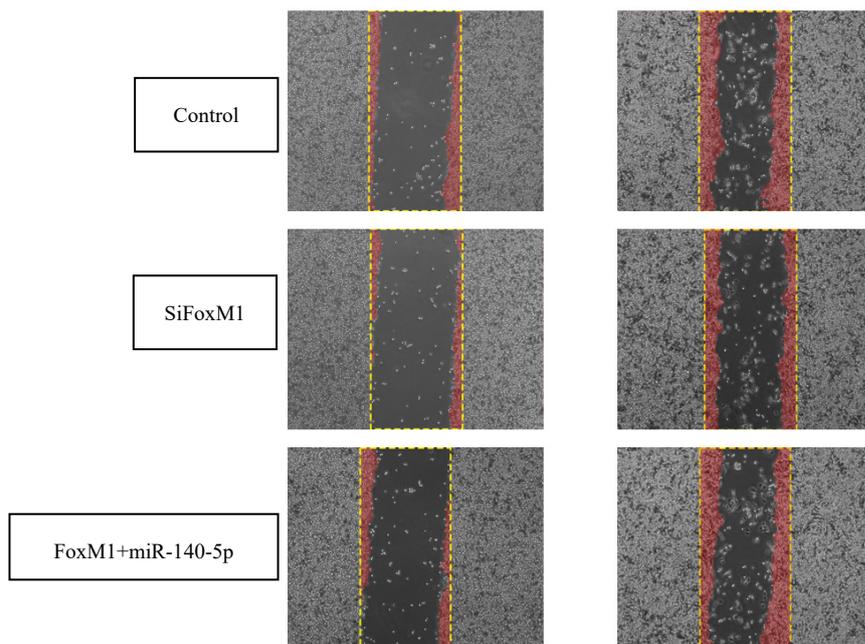


图 5 FoxM1 对 SW480 细胞迁移能力的影响

FoxM1 在结直肠癌中的表达情况及其临床意义也是研究的重点。FoxM1 在结直肠癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织，并且其高表达与肿瘤的淋巴结转移和肿瘤的复发明显相关。

作者通过双荧光素酶报告检测发现 miR-140-5p 与 FoxM1 的存在调控关系，FoxM1 基因的蛋白表达提示 miR-140-5p 在转录后负向调控 FoxM1 的表达，通过下调 FoxM1 的表达，可以显著抑制结肠癌细胞的增殖能力。这些发现表明，FoxM1 可能成为结直肠癌治疗的有效靶点。

本研究发现 FoxM1+miR-140-5p 组的生长速率最快，这可能表明 FoxM1 的过表达促进了细胞增殖，而 miR-140-5p 的存在可能没有完全抑制这种促进作用，

或者可能有其他因素增强了细胞增殖。这些数据可能表明 FoxM1 基因在细胞增殖中起着重要作用，其过表达可以促进细胞增殖，而沉默 FoxM1 基因则会减缓增殖。同时，miR-140-5p 对 FoxM1 的调控作用可能不是简单的抑制，可能还涉及其他复杂的细胞信号通路。这提示我们，在研究 miR-140-5p 和 FoxM1 的调控关系时，需要考虑到它们在不同细胞和组织背景下的复杂性及差异性。

综上所述，miR-140-5p 和 FoxM1 在结直肠癌的发生发展中起着关键作用，它们可能成为结直肠癌治疗的潜在靶点。未来的研究需要进一步探索它们在结直肠癌中的具体作用机制，以及如何利用这些分子进行治疗干预。

参考文献

- [1] 禹蓉,董卫国,田山,等.不同病理类型结直肠息肉癌变的临床研究进展[J].中国全科医学, 2023, 26(14):1790-1794.
- [2] 曾玥,王秀玉,马星,等.MicroRNA-145 在动脉粥样硬化血管平滑肌细胞增殖迁移及表型转化中的研究进展[J].宁夏医科大学学报, 2023, 45(7):731-738.
- [3] 刘进生,黄良祥,李建党,等.miR-140-5p 调控 Nrf2 影响结肠癌细胞 5-FU 耐药性[J].中国癌症防治杂志, 2018, 10(3):193-198.
- [4] 冒晓蓓,刘小北,徐凯,et al.叉头框转录因子 M1 对人结肠癌细胞恶性表型的影响[J].医学研究生学报, 2014, 27(6):582-

586.

- [5] 延飞飞,李宏武.miR-140-5p 通过调节自噬影响结直肠癌细胞对奥沙利铂的敏感性[J].实用医学杂志, 2021, 37(23):2984-2988.
- [6] 杨侃侃.FOXM1 在结直肠癌中的表达及对结肠癌细胞增殖和迁移侵袭能力的实验研究[D].苏州大学.

版权声明: ©2024 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS