

miR-29家族通过AKT/mTOR信号通路抑制结肠癌MC38细胞的增殖、迁移和侵袭

郑诚^{1,2} 东方阳¹ 程蕾² 刘可可^{1,2} 毋文静^{2*} 张瑾^{2*}

(¹河北科技师范学院农学与生物科技学院, 秦皇岛 066000; ²嘉兴学院生物与化学工程学院, 嘉兴 314000)

摘要 结肠癌是最常见的恶性肿瘤之一, 死亡人数仅次于肺癌。有研究发现miR-29家族成员(miR-29a、miR-29b和miR-29c)在结肠癌组织中的表达水平显著低于癌旁组织, 但其对结肠癌的影响不明。为探讨miR-29家族对结肠癌的影响及作用机制, 该研究在结肠癌细胞系MC38中分别转染miR-29a/b/c-3p mimics, 利用qRT-PCR、CCK-8、EdU染色等实验确定miR-29家族成员可以显著降低MC38细胞的增殖能力($P<0.05$); 通过划痕实验和Transwell侵袭实验, 明确miR-29家族成员可显著抑制MC38细胞的迁移和侵袭($P<0.05$); 最后利用信号通路活性分析、双荧光素酶报告分析等确定miR-29家族成员能够抑制AKT/mTOR信号通路的活性, 并且与束蛋白结合蛋白1(Fascin actin-bundling protein 1, *FSCN1*)存在相互作用。上述结果表明, miR-29家族成员能够抑制AKT/mTOR信号通路活性, 进而降低结肠癌细胞MC38增殖、迁移和侵袭的能力。

关键词 miR-29; 结肠癌; 增殖; 迁移; 侵袭

miR-29 Family Inhibits the Proliferation, Migration and Invasion of Colon Cancer MC38 Cells Through the AKT/mTOR Signaling Pathway

ZHENG Cheng^{1,2}, DONGFANG Yang², CHENG Lei², LIU Keke^{1,2}, WU Wenjing^{2*}, ZHANG Jin^{2*}

(¹College of Agronomy and Biotechnology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066000, China;

²College of Biological Chemical Sciences and Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314000, China)

Abstract Colon cancer is one of the most common malignant tumors. The number of deaths caused by colon cancer is second only to lung cancer. Studies have found that the expression of the miR-29 family members (miR-29a, miR-29b, and miR-29c) in colon cancer tissue was significantly lower than in paracancerous tissue, but its effect on colon cancer is unknown. In order to explore the effect and mechanism of the miR-29 family members on colon cancer, a colon cancer cell line MC38 was used for the transfection of miR-29a/b/c-3p mimics individually in this research. qRT-PCR, CCK-8 and EdU staining experiments proved that the miR-29 family members could inhibit the proliferation of MC38 cells ($P<0.05$). Cell wound scratch assay and Transwell invasion experiment showed that the miR-29 family members could suppress the migration and invasion of MC38 cells ($P<0.05$). Finally, the signaling pathway analysis and dual-luciferase report assay indicated that the miR-29 family members could decrease the activity of AKT/mTOR signaling pathway and interact with *FSCN1* (Fascin actin-bundling protein 1).

收稿日期: 2021-11-05 接受日期: 2022-01-26

国家自然科学基金(批准号: 32102506、32172708)、嘉兴市公益性研究计划(批准号: 2021AY10046)、浙江省医学电子与数字健康重点实验室和生命健康智能感知浙江省工程研究中心资助的课题

*通讯作者。Tel: 13736433510, E-mail: wuwenjing19851020@163.com; Tel: 13516831490, E-mail: zhangjin7688@163.com

Received: November 5, 2021 Accepted: January 26, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32102506, 32172708), the Public Welfare Research Program of Jiaxing (Grant No.2021AY10046), and the Key Laboratory of Medical Electronics and Digital Health of Zhejiang Province and Engineering Research Center of Intelligent Human Health Situation Awareness of Zhejiang Province

*Corresponding authors. Tel: +86-13736433510, E-mail: wuwenjing19851020@163.com; Tel: +86-13516831490, E-mail: zhangjin7688@163.com

The above results indicated that the miR-29 family members could reduce the proliferation, migration and invasion of colon cancer cell line MC38 by inhibiting the activity of AKT/mTOR signaling pathway.

Keywords miR-29; colon cancer; proliferation; migration; invasion

结肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤^[1], 2020年, 全球因结肠癌死亡的人数约为93.5万人, 仅次于肺癌^[2]。结肠癌主要发生在直肠与乙状结肠交界处, 其易复发和易转移是患者预后较差的重要原因之一^[3], 因此深入研究结肠癌细胞增殖、转移和侵袭的分子机制, 有助于改善结肠癌的治疗和预后, 提高患者生存率。

miRNA是一类非编码单链小分子RNA, 在转录后水平调节基因的表达。已有研究表明, miRNA在肿瘤发生发展中发挥重要作用^[4-5], 可作为肿瘤的诊断标志或治疗靶点^[6-7]。miR-29家族包括miR-29a、miR-29b和miR-29c这3个成员, 有研究发现其在多种肿瘤组织中表达异常, miR-29a在胰腺癌组织中表达显著升高^[8], miR-29b在卵巢癌组织中的表达显著降低^[9], miR-29c在早期复发结肠癌组织中的表达显著低于非早期复发结肠癌组织^[10]。进一步研究发现, miR-29调控的基因参与多种肿瘤细胞的代谢、增殖、分化、凋亡等生物学过程, 如超表达miR-29能够抑制肝癌细胞的增殖^[11], 而抑制miR-29表达可以降低胰腺癌的增殖、侵袭和转移能力^[12], 这表明miR-29在不同癌症中发挥不同的作用, 具有促癌或抑癌的双重作用。但是, miR-29家族对结肠癌的影响及作用机制尚无报道。

本研究选用结肠癌细胞系MC38, 通过分别转染miR-29a/b/c-3p mimics, 明确了miR-29家族各成员对结肠癌细胞的增殖、迁移以及侵袭能力的抑制作用和对AKT/mTOR信号通路活性的调控作用, 并且确定了miR-29家族成员的靶基因为束蛋白结合蛋白1(Fascin actin-bundling protein 1, *FSCN1*)。本研究揭示了miR-29家族成员在结肠癌细胞中的作用机制, 为结肠癌的治疗提供了候选靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 小鼠结肠癌细胞MC38和HEK293T细胞由本实验室保存, 细胞用含10%胎牛血清以及1%青-链霉素双抗的DMEM高糖培养基, 于37℃、5% CO₂的培养箱中培养。每48 h换液一次, 待细胞融合度达到80%~90%时进行传代。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMEM高糖培养基、青-链霉素双抗均购自美国HyClone公司; 新生牛血清购自杭州四季青生物技术有限公司; miR-29-3p mimics(miR-29a-3p mimics、miR-29b-3p mimics、miR-29c-3p mimics)、U6引物均购自广州锐博生物科技有限公司; 脂质体lipofectamine 2000、TRIzol试剂均购自美国Invitrogen公司; BCA蛋白定量试剂盒、反转录试剂盒、2× Plus SYBR real-time PCR Mixture试剂均购自北京康为世纪生物科技有限公司; Transwell基质胶购自美国BD公司; Transwell小室购自美国Corning公司; 双荧光素酶检测试剂盒购自美国Promega公司; ECL化学发光超敏显色试剂盒购自美国Millipore公司; 其他引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成; p-AKT(#9271, 1:1 000)、AKT(#9272, 1:1 000)、p-mTOR(#5536, 1:1 000)、mTOR(#2983, 1:1 000)抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司; GAPDH(ARG10112, 1:1 000)购自中国Arigobio公司; HRP标记的羊抗鼠抗体(1:10 000)、HRP标记的羊抗兔抗体(1:10 000)均购自上海帛龙生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 取对数期结肠癌MC38细胞, 用PBS缓冲液清洗细胞, 胰酶消化后加入培养基终止消化, 并将MC38细胞转移到10 mL离心管中。1 500 r/min离心5 min后用培养基悬浮细胞, 计数后将细胞接种到12孔板中, 细胞融合度达到40%~50%时, 将细胞分为空白对照(NC)组、miR-29a-3p mimics组、miR-29b-3p mimics组以及miR-29c-3p mimics组。先用60 μL 1× riboFECT™ CP缓冲液分别稀释5 μL 20 μmol/L NC mimics、miR-29a-3p mimics、miR-29b-3p mimics以及miR-29c-3p mimics试剂, 轻轻混匀, 然后各加入6 μL riboFECT™ CP试剂, 轻轻吹打混匀, 室温孵育15 min, 制备成转染复合物, 此为12孔细胞培养板每孔的用量, 最终将制备好的riboFECT™ CP转染复合物均匀滴加至含培养基的细胞培养板中, 转染48 h后提取细胞RNA, 检测转染效率。

1.2.2 总RNA提取和qRT-PCR 利用TRIzol裂解法

提取总RNA, 核酸定量仪检测RNA质量和浓度。参照康为反转录试剂盒说明书进行反转录, 采用qRT-PCR方法检测相关基因mRNA的表达量, miR-29家族成员以U6为内参基因, 其余以GAPDH为内参基因, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达丰度, 引物信息见表1。

1.2.3 CCK-8法 利用CCK-8法检测细胞活性, 取对数生长期细胞, 调整浓度至 5×10^4 个/mL, 取100 μ L细胞悬液接种于96孔板中。待细胞融合度达到40%~50%时, 分别用miR-29a-3p mimics、miR-29b-3p mimics、miR-29c-3p mimics以及NC mimics试剂进行转染。培养24 h后以换液形式于每孔加入100 μ L CCK-8检测试剂(CCK-8:DMEM培养基=1:9), 4个无细胞孔为空白对照。37 $^{\circ}$ C培养箱孵育2 h后于450 nm波长处检测吸光度(D)值, 计算细胞增殖活性, 每组设置4个重复。

1.2.4 EdU染色 利用EdU染色法检测细胞增殖能力, 细胞分组、接种及转染同1.2.1, 采用EdU试剂盒染色, 4%多聚甲醛固定后用0.5% Triton X-100渗透10 min, Apollo染色反应液室温避光孵育30 min, 0.5% Triton X-100洗3次, Hoechst33342反应液复染。荧光倒置显微镜下观察拍照, 用ImageJ软件计数EdU阳性细胞, 每组设置4个重复。

1.2.5 细胞划痕实验 利用细胞划痕法检测细胞迁移能力, 实验前预先在12孔板背面划三条直线, 每条线间隔约0.5 cm。细胞转染48 h后, 垂直于预先画的直线进行划线, PBS清洗后加入DMEM培养基, 放入37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱继续培养。在划线后的第0 h、12 h和24 h时, 分别在显微镜下观察拍照, 计算细胞迁移率, 每组设置3个重复。

1.2.6 Transwell侵袭实验 选择直径6.5 mm、孔径8 μ m的Transwell板检测细胞侵袭能力。转染24 h后胰酶消化细胞, 1 500 r/min离心5 min收集细胞, 用无

血清培养基重悬, 调整密度至 2×10^5 个/mL备用。在Transwell小室上室铺上60 μ L预冷的Matrigel胶(无血清DMEM:Matrigel=8:1), 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱2 h使其凝固后, 每孔加入200 μ L细胞悬液。下室加入600 μ L含10%胎牛血清的培养基, 置入37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养24 h后取出细胞并固定染色, 倒置显微镜下观察并拍照, 用ImageJ软件计数, 每组设置3个重复。

1.2.7 双荧光素酶基因报告分析 构建FSCN1基因3'端非翻译区(3'UTR)野生型重组psi-CHECK2荧光素酶报告载体, 通过双荧光素酶报告基因系统验证miR-29家族和FSCN1的靶向关系。取对数生长期MC38细胞悬液接种于96孔板, 按转染试剂说明书进行共转染。分为以下四组: NC mimics和FSCN1-3'UTR、miR-29a-3p mimics和FSCN1-3'UTR、miR-29b-3p mimics和FSCN1-3'UTR, 以及miR-29c-3p mimics和FSCN1-3'UTR。培养48 h后按照双荧光素酶检测试剂盒说明书检测荧光素酶活性, 以海肾荧光素酶为内参。每组设置4个重复。

1.2.8 蛋白提取及Western blot实验 对数期细胞转染24 h后, 用PBS洗2次, 加入适量完全蛋白裂解液, 冰上裂解30 min后刮取细胞收集总蛋白, 采用BCA法测定总蛋白浓度并将各组样本蛋白浓度调整一致, 最后加入1/4体积的5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混合并煮沸变性。通过12% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白并转膜, 5%脱脂牛奶室温封闭2 h。加入相对应的一抗稀释液(1:1 000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。第二天用二抗稀释液(1:10 000)室温孵育1 h, 洗膜后加入发光液, 使用Bio-Rad成像系统曝光, ImageJ软件测定灰度值, 以GAPDH为内参, 目标蛋白分别与内参灰度值相比为各自表达水平。

表1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
AKT1	Forward: TGA GGT TGC CCA CAC GCT TA
	Reverse: CCC GTT GGC ATA CTC CAT GAC
VEGF	Forward: CAT CTT CAA GCC GTC CTG TGT G
	Reverse: GTG CTG GCT TTG GTG AGG TTT
EGFR	Forward: CCT CCA CTG TCC AGC TCA TTA C
	Reverse: TTC CAG GTA GTT CAT GCC CTT T
GAPDH	Forward: TGC TGA GTA TGT CGT GGA GTC T
	Reverse: ATG CAT TGC TGA CAA TCT TGA G

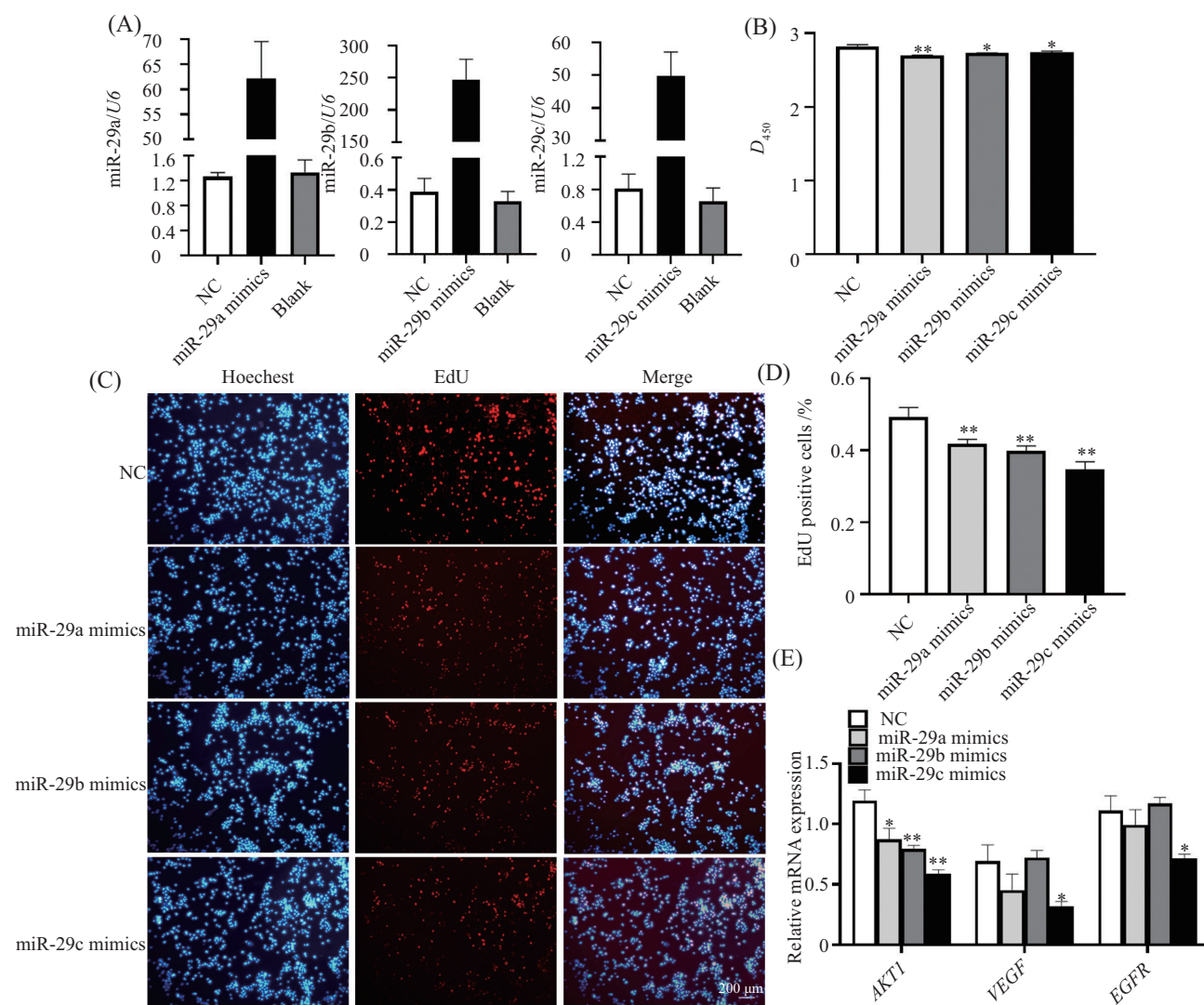
1.2.9 统计分析 采用Graph Pad Prism 8进行统计学分析和制图,实验数据以平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)的形式表示,通过Student's *t*检验进行显著性差异分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义,其中,* $P<0.05$ 为差异显著,** $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 miR-29家族成员抑制MC38细胞增殖

为研究miR-29a/b/c对结肠癌细胞MC38增殖的

影响,用miR-29家族成员模拟剂(miR-29a/b/c mimics)转染MC38细胞系,36 h后收集细胞并提取RNA,检测miR-29家族成员的表达效率。结果显示,miR-29a/b/c mimics能够显著上调miR-29家族成员的表达量($P<0.01$)(图1A)。利用CCK-8法、EdU染色检测细胞增殖能力,结果显示超表达miR-29家族成员可显著抑制细胞增殖能力($P<0.05$)(图1B~图1D);用qRT-PCR检测结肠癌增殖相关基因发现,超表达miR-29家族成员均可显著降低AKT1(v-akt murine



A: miR-29家族成员的超表达水平(U6为内参基因); B: CCK-8法检测miR-29家族成员对MC38细胞增殖的影响; C: EdU染色检测miR-29家族成员对MC38细胞增殖的影响; D: EdU染色检测miR-29家族成员对MC38细胞增殖影响的统计图; E: 采用qRT-PCR技术检测细胞中AKT1、VEGF、EGFR基因的表达水平(GAPDH为内参基因)。n=3, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与NC组相比较。

A: the overexpression levels of miR-29 family members (U6 as the internal reference gene); B: CCK-8 method detects the effect of miR-29 family members on the proliferation of MC38 cells; C: EdU staining detects the effect of miR-29 family members on the proliferation of MC38 cells; D: statistical graph of EdU staining detecting the effect of miR-29 family members on MC38 cell proliferation; E: qRT-PCR technology is used to detect the expression levels of AKT1, VEGF, and EGFR genes in cells (GAPDH as the internal reference gene). n=3, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with NC group.

图1 超表达miR-29家族成员抑制MC38细胞增殖能力

Fig.1 Overexpression of miR-29 family members inhibits the proliferation of MC38 cells

thymoma viral oncogene homolog 1)的表达水平,而超表达miR-29c还可显著降低血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, *VEGF*)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)的表达水平($P<0.05$)(图1E)。

2.2 miR-29家族成员抑制MC38细胞的迁移和侵袭

利用划痕实验检测miR-29家族各成员对结肠癌细胞迁移能力的影响,分别转染miR-29a/b/c mimics后,MC38细胞的迁移显著低于对照组,其中miR-29c mimics对细胞迁移能力的抑制作用最强($P<0.05$)(图2)。利用Transwell实验检测miR-29家族对结肠癌细胞侵袭能力的影响,发现分别转染miR-29a/b/c mimics后,MC38细胞穿过Transwell小室的数目显著减少($P<0.01$)(图3)。

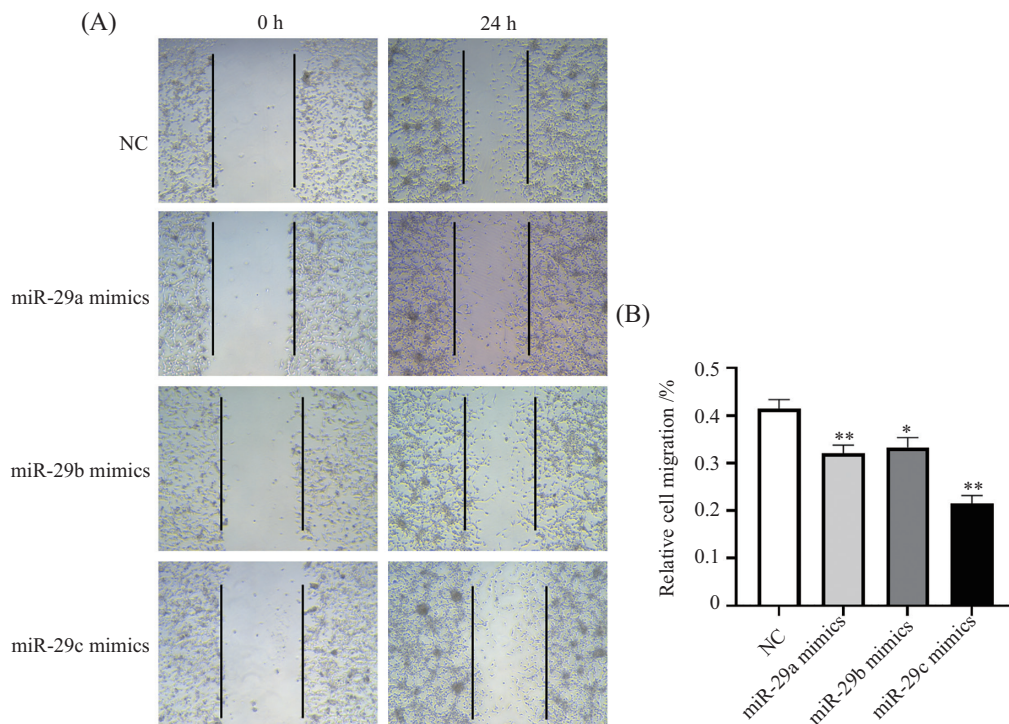
2.3 miR-29家族成员抑制AKT/mTOR信号通路活性

AKT/mTOR信号通路在癌细胞的增殖、迁移和侵袭过程中扮演了十分重要的角色。分别转染miR-29a/b/c mimics后,检测MC38细胞内p-AKT、AKT、

p-mTOR和mTOR的蛋白表达水平(图4A)。结果表明,超表达miR-29a/b/c均可显著降低AKT和mTOR的磷酸化水平(图4B和图4C),提示miR-29家族可能通过降低AKT/mTOR信号通路活性,抑制结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

2.4 miR-29家族成员靶向抑制*FSCN1*基因在结肠癌细胞中的表达

利用TargetScan、miRDB网站预测miR-29家族成员的靶基因,发现*FSCN1*可能是miR-29家族潜在的靶基因(图5A)。通过qRT-PCR检测发现,在MC38细胞内过表达miR-29家族能够显著降低*FSCN1*的表达量($P<0.05$)(图5B);为了验证miR-29家族是否直接靶向*FSCN1*,用psi-CHECK-2-*FSCN1* 3'UTR与miR-29a/b/c mimics或NC mimics共转染HEK293T细胞,培养细胞48 h后检测荧光素酶的表达式变化。结果显示:与对照组相比,psi-CHECK-2-*FSCN1* 3'UTR载体和miR-29a/b/c mimics共转染会明显降低海肾荧光强度与萤火虫荧光强度的比值(图5C),说明miR-29家族成员均可与*FSCN1* 3'UTR片段直接结合。

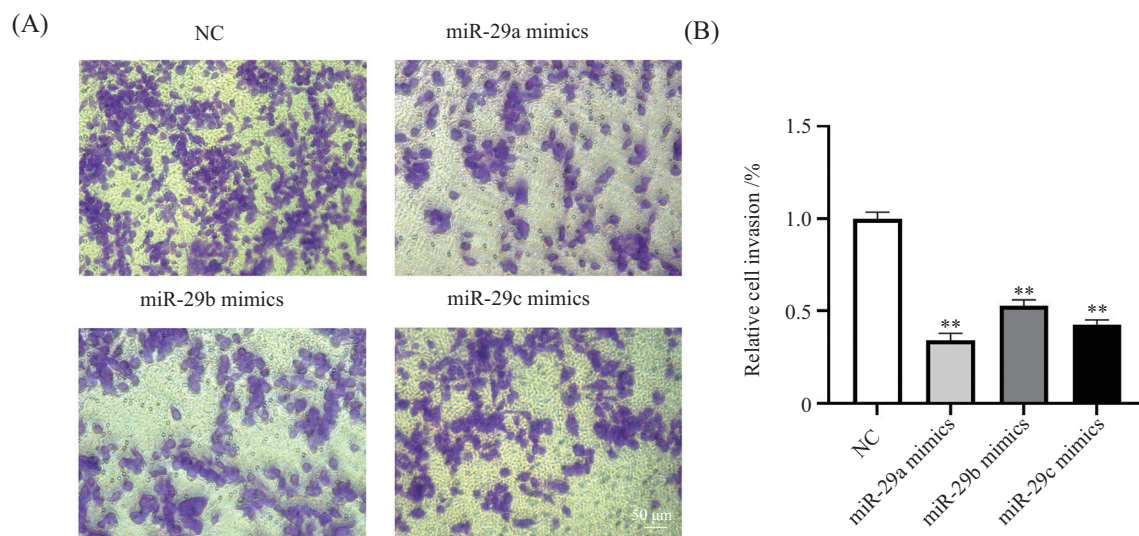


A: 细胞划痕实验检测miR-29家族成员对MC38细胞迁移的影响; B: 细胞划痕实验检测miR-29家族成员对MC38细胞迁移影响的结果统计图。 $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与NC组相比较。

A: cell wound scratch assay to detect the effect of miR-29 family members on the migration of MC38 cells; B: statistical graph of cell wound scratch assay to detect the effect of miR-29 family members on MC38 cell migration. $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with NC group.

图2 超表达miR-29家族成员抑制MC38细胞迁移

Fig.2 Overexpression of miR-29 family members inhibits the migration of MC38 cells

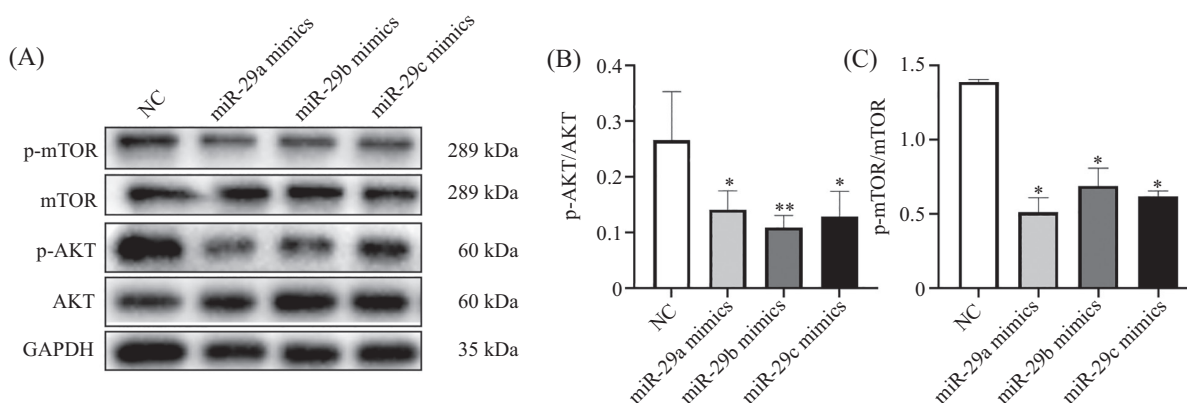


A: Transwell实验检测miR-29家族成员对MC38细胞侵袭的影响; B: Transwell实验检测miR-29家族成员对MC38细胞迁移影响的结果统计图。 $n=3$, ** $P<0.01$, 与NC组相比较。

A: Transwell experiment to detect the effect of miR-29 family members on the migration of MC38 cells; B: statistical graph of Transwell experiment to detect the effect of miR-29 family members on MC38 cell migration. $n=3$, ** $P<0.01$ compared with NC group.

图3 超表达miR-29家族成员抑制MC38细胞侵袭

Fig.3 Overexpression of miR-29 family members inhibits the invasion of MC38 cells



A: Western blot检测细胞中蛋白表达水平; B、C: Western blot检测细胞蛋白水平的统计图。 $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与NC组相比较。

A: Western blot to detect protein expression levels in cells; B,C: statistical graph of Western blot to detect protein expression levels in cells. $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with NC group.

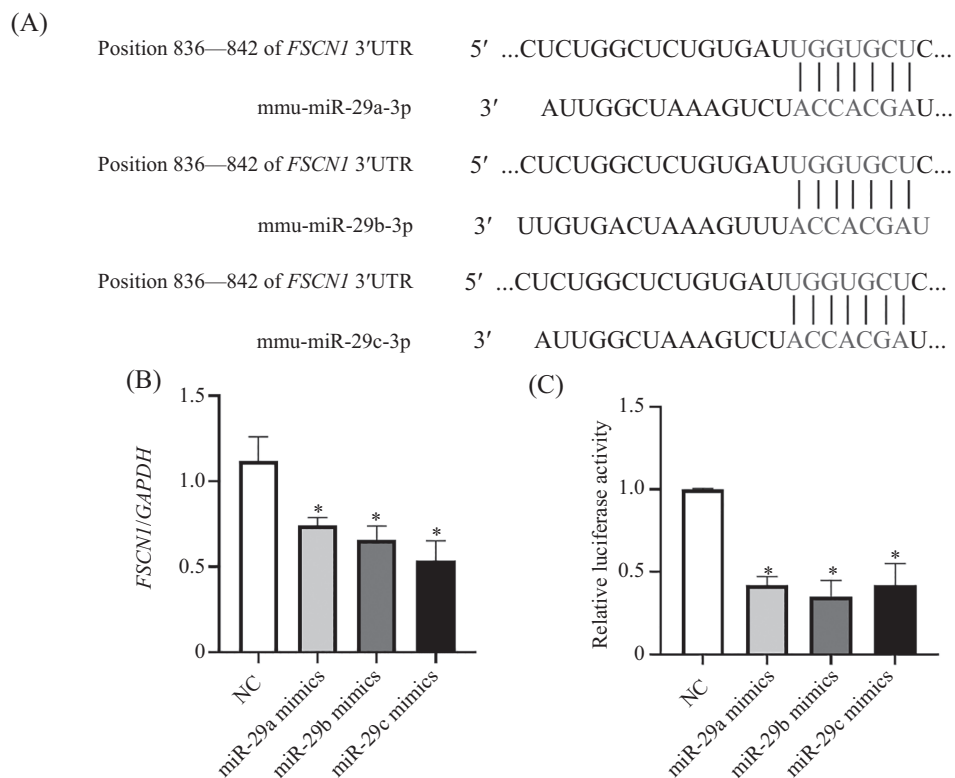
图4 超表达miR-29家族成员抑制AKT/mTOR信号通路活性

Fig.4 Overexpression of miR-29 family members inhibits the activity of AKT/mTOR signaling pathway

3 讨论

随着我国经济的发展,人们的生活习惯发生了巨大的改变,结肠癌已成为最常见的恶性肿瘤之一,在我国的发病率逐年上升。目前手术、放疗和化疗仍是结肠癌最主要的治疗手段,但其治疗及预后效果差。因此,应深入认识结肠癌细胞增殖、迁移、侵袭的调控机制,发掘潜在的新靶点,为药物开发奠定基础。miRNA与肿瘤的发生发展密切相关,有可能成为肿瘤诊断的分子标志物 and 治疗的靶点^[13-14]。有研究表明miR-29家族成员在结肠癌组织中表达显

著降低,在未转移或发生转移的原位结肠癌组织中的表达量显著低于正常结肠组织^[15],但miR-29家族成员在结肠癌的发生、发展、扩散等病理过程中是否发挥作用、发挥何种作用,迄今尚无报道。本研究选用了MC38细胞系来研究miR-29家族成员在结肠癌中的作用及机制。MC38细胞系是一种高免疫原性的鼠源肿瘤细胞模型,与其他结肠癌细胞系(如CT26)相比,对免疫疗法的响应与临床取得的数据最接近,是使用最广泛的鼠源结肠癌细胞模型^[16]。我们在MC38细胞中分别过表达miR-29a/b/c,通过CCK-8



A: 使用TargetScan确定*FSCN1* 3'UTR包含miR-29家族结合位点的示意图; B: qRT-PCR检测超表达miR-29家族时*FSCN1*的表达量; C: miR-NC或miR-29家族成员与报告质粒共转染HEK293T细胞后双荧光素酶活性检测。n=3, **P*<0.05, 与NC组相比较。

A: schematic of the target site of miR-29a/b/c within the 3'UTR of the *FSCN1* mRNA identified using TargetScan; B: the expression level of *FSCN1* was detected by qRT-PCR after miR-29 family members overexpression; C: detection of dual-luciferase activity after co-transfection of miR-NC or miR-29 family members with the reporter plasmid into HEK293T cells. n=3, **P*<0.05 compared with NC group.

图5 miR-29家族成员对*FSCN1*的靶向调控

Fig.5 miR-29 family members targets and regulates *FSCN1*

法、EdU染色、划痕实验和Transwell侵袭等实验,发现了超表达miR-29家族的3个成员均能够抑制结肠癌细胞MC38的增殖、转移和侵袭,证明了miR-29家族成员在结肠癌细胞中发挥重要的调控作用,并且鉴定了其所影响的信号通路和互作的靶基因,为深入认识结肠癌的调控网络提供了新信息。

有研究表明, *AKT1*、*VEGF*、*EGFR*与结肠癌细胞的发生发展密切相关^[17-19]。*AKT1*基因编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,能通过磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)依赖的机制被胞外信号激活^[20]。当细胞中*AKT1*异常激活时,细胞的增殖、迁移和侵袭能力增强,从而导致肿瘤的发生发展^[21]。*AKT1*在结肠癌组织中高表达,且敲除*AKT1*后能减少肿瘤的转移和抑制结肠癌细胞的生长^[17]。本研究发现,超表达miR-29家族成员能够抑制*AKT1*表达水平。*VEGF*是最重要的促血管生长因子,与血管内皮细胞增殖和迁移相关。*VEGF*在正常组织中表达水平较低,而在肿瘤组织中表达水平

较高,提示其能促进肿瘤血管生成,这和肿瘤的持续生长有密切关系^[22]。已有研究表明, *VEGF*在结肠癌组织中的表达量显著高于正常黏膜组织,并且是患者预后的重要生物学参考指标之一^[18]。*EGFR*广泛表达于表皮细胞和基质细胞,部分分布在神经胶质细胞和平滑肌细胞,是酪氨酸激酶I型受体家族中的一员。*EGFR*与细胞生长、DNA合成以及癌基因表达有关,其高表达能够促进肿瘤细胞增殖和转移,抑制肿瘤细胞的凋亡^[23]。结肠癌组织中*EGFR*表达水平显著高于正常黏膜组织^[19],并且与结直肠癌的浸润和淋巴结转移呈正相关。*VEGF*和*EGFR*的过表达能够通过多种途径参与肿瘤血管生成,本研究发现过表达miR-29c能够显著降低*VEGF*和*EGFR*的表达,而过表达miR-29a/b对*VEGF*和*EGFR*的表达并无影响,这提示miR-29c对结肠癌细胞MC38增殖的作用强于miR-29a/b,且可能与*VEGF*和*EGFR*的表达有关。

AKT/mTOR是细胞内十分重要的一条信号通路,

AKT被磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(phosphoinositide dependent protein kinase-1, PDK1)磷酸化而活化成p-AKT^[24],后者可以介导下游mTOR信号转导。p-mTOR是AKT磷酸化mTOR而形成的一种丝氨酸/苏氨酸激酶,mTOR被激活后,参与肿瘤细胞的增殖和侵袭等生物学行为^[25-26]。已有研究发现,多种肿瘤的发生发展与AKT/mTOR通路异常有关^[27-28]。其中miR-21在卵巢癌组织中超表达,通过AKT/mTOR通路促进肿瘤的发生发展^[29]。miR-29a通过PI3K/AKT/mTOR通路参与调控子宫内膜癌的发生发展^[30]。进一步探究超表达miR-29a/b/c对AKT/mTOR信号通路中关键因子表达的影响,结果表明,超表达miR-29家族成员的结肠癌细胞MC38中p-AKT和p-mTOR水平均降低,提示miR-29家族成员的超表达抑制了AKT/mTOR通路活性。

通过靶基因预测我们发现,超表达miR-29家族成员下调了*FSCN1*的表达。*FSCN1*与肿瘤的发生发展密切相关^[31],发挥了包括介导细胞信号转导、调节基因表达和促进微丝聚集等在内的多重作用。*FSCN1*在多种肿瘤中表达上调,在结肠癌、胃癌、前列腺癌、肺癌等肿瘤中均可观察到*FSCN1*的超表达^[32-34]。已有研究表明,miR-145-5p通过靶向*FSCN1*调控结肠癌细胞的增殖并促进其凋亡^[35];沉默*FSCN1*能够抑制AKT信号通路的活性进而抑制胶质瘤细胞转移和侵袭^[36]。鉴于*FSCN1*在肿瘤中的发挥的重要作用,本研究通过双荧光素酶报告分析确定*FSCN1*是miR-29家族成员的靶基因,但*FSCN1*是否在miR-29家族成员影响结肠癌细胞中发挥关键作用,miR-29家族是否通过靶向*FSCN1*抑制AKT信号通路,均有待验证。

综上所述,本研究发现超表达miR-29家族成员,能够抑制AKT/mTOR通路的激活进而抑制结肠癌细胞MC38的增殖、迁移和侵袭。同时,作为miR-29家族成员的靶基因,*FSCN1*表达下调,这为结肠癌的治疗提供了潜在的新靶点。

参考文献 (References)

- [1] WU R, WANG L, YIN R, et al. Epigenetics/epigenomics and prevention by curcumin of early stages of inflammatory-driven colon cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(2): 227-36.
- [2] 刘超宗, 李哲轩, 张阳, 等. 2020全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志(LIU Z C, LI Z X, ZHANG Y, et al. Interpretation on the report of Global Cancer Statistics 2020 [J]. *Journal of Multidisciplinary Cancer Management, Electronic Version*), 2021, 7(2): 1-14.
- [3] 潘琼, 谷见法, 刘松格, 等. miR-133过表达对结肠癌细胞SW480凋亡、增殖和裸鼠成瘤的影响[J]. 天津医科大学学报(PAN Q, GU J F, LIU S G, et al. Effects of miR-133 overexpression on apoptosis, proliferation and tumor formation of colon cancer cells SW480 in nude mice [J]. *Journal of Tianjin Medical University*), 2021, 27(5): 472-6.
- [4] FILIPOWICZ W, BHATTACHARYA S N, SONENBERG N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight [J]? *Nat Rev Genet*, 2008, 9(2): 102-14.
- [5] XU Y, QIN S, AN T, et al. MiR-145 detection in urinary extracellular vesicles increase diagnostic efficiency of prostate cancer based on hydrostatic filtration dialysis method [J]. *Prostate*, 2017, 77(10): 1167-75.
- [6] D'URSO P I, D'URSO O F, STORELLI C, et al. miR-155 is up-regulated in primary and secondary glioblastoma and promotes tumour growth by inhibiting GABA receptors [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(1): 228-34.
- [7] LI X, GONG X, CHEN J, et al. miR-340 inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing CDK6, cyclin-D1 and cyclin-D2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(3): 670-7.
- [8] SUN X J, LIU B Y, YAN S, et al. MicroRNA-29a promotes pancreatic cancer growth by inhibiting tristetraprolin [J]. *Cell physiol Biochem*, 2015, 37(2): 707-18.
- [9] DAI F, ZHANG Y, CHEN Y. Involvement of miR-29b signaling in the sensitivity to chemotherapy in patients with ovarian carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(6): 1285-93.
- [10] YANG I P, TSAI H L, HUANG C W, et al. The functional significance of microRNA-29c in patients with colorectal cancer: a potential circulating biomarker for predicting early relapse [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66842.
- [11] 胡超, 王新保. microRNA对肝癌细胞生物学行为影响的研究进展[J]. 腹部外科(HU C, WANG X B. Research progress of the effects of microRNA on biological behaviors of hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Abdom Surg*), 2019, 32(5): 385-90.
- [12] 陈栋, 赵萍, 陆连芳, 等. 抑制miR-29对胰腺癌PANC1细胞生长、侵袭和转移的影响[J]. 中华胰腺病杂志(CHEN D, ZHAO P, LU L F, et al. Inhibiting miR-29 on growth, invasion and metastasis of PANC1 cells [J]. *Chin J Pancreatol*), 2017, 17(6): 386-92.
- [13] LU Z, HE Q, LIANG J, et al. miR-31-5p is a potential circulating biomarker and therapeutic target for oral cancer [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16: 471-80.
- [14] KWAN J Y, PSARIANOS P, BRUCE J P, et al. The complexity of microRNAs in human cancer [J]. *J Radiat Res*, 2016, doi: 10.1093/jrr/rw009.
- [15] DEHAL A, GRAFF-BAKER AN, VUONG B, et al. Neoadjuvant chemotherapy improves survival in patients with clinical T4b colon cancer [J]. *J Gastrointest Surg*, 2018, 22(2): 242-9.
- [16] 白杰, 高志涛, 石龙, 等. 探讨PD-1抑制剂在不同小鼠肿瘤模型中的应答差异[J]. 解放军医学院学报(BAI J, GAO Z T, SHI L, et al. Differential PD-1 inhibitor efficacy among different mouse tumor models [J]. *Acad J Chin PLA Med Sch*), 2019, 40(4): 357-63.
- [17] HÄGGBLAD SAHLBERG S, MORTENSEN A C, HAGLÖF J, et al. Different functions of AKT1 and AKT2 in molecular pathways, cell migration and metabolism in colon cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(1): 5-14.
- [18] FANG X, HONG Y, DAI L, et al. CRH promotes human colon cancer cell proliferation via IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway

- and VEGF-induced tumor angiogenesis [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(11): 2434-45.
- [19] ALAM K J, MO J S, HAN S H, et al. MicroRNA 375 regulates proliferation and migration of colon cancer cells by suppressing the CTGF-EGFR signaling pathway [J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(8): 1614-29.
- [20] LEE J O, CHOI E, SHIN K K, et al. Compound K, a ginsenoside metabolite, plays an antiinflammatory role in macrophages by targeting the AKT1-mediated signaling pathway [J]. *J Ginseng Res*, 2019, 43(1): 154-60.
- [21] TIWARI V, KAMRAN M Z, RANJAN A, et al. Akt1/NF κ B signaling pathway activation by a small molecule DMA confers radioprotection to intestinal epithelium in xenograft model [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 564-74.
- [22] RMALI K A, PUNTIS M C, JIANG W G. Tumour-associated angiogenesis in human colorectal cancer [J]. *Colorectal Dis*, 2007, 9(1): 3-14.
- [23] TAMAS P, SOLT Z, BAUER P, et al. Mechanism of epidermal growth factor regulation of Vav2, a guanine nucleotide exchange factor for Rac [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(7): 5163-71.
- [24] JEYAMOCHAN S, MOORTHY R K, KANNAN M K, et al. Parthenolide induces apoptosis and autophagy through the suppression of PI3K/Akt signaling pathway in cervical cancer [J]. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(8): 1251-60.
- [25] MOSSMANN D, PARK S, HALL M N. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(6): 744-57.
- [26] SAXTON R A, SABATINI D M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease [J]. *Cell*, 2017, 169(2): 361-71.
- [27] TEWARI D, PATNI P, BISHAYEE A, et al. Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: a novel therapeutic strategy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 80: 1-17.
- [28] RAHMANI F, ZIAEMEHR A, SHAHIDSALES S, et al. Role of regulatory miRNAs of the PI3K/AKT/mTOR signaling in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(5): 4146-52.
- [29] 杨洁, 陈曼玲. MiR-21介导 Akt/mTOR信号通路调控卵巢癌细胞增殖和凋亡[J]. 中国优生与遗传杂志(YANG J, CHEN M L. Effects of miR-21 on proliferation of ovarian cancer cells through AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*), 2021, 29(4): 508-12.
- [30] 王彩霞, 夏敏, 王洁, 等. microRNA-29a通过PI3K/AKT/mTOR信号途径抑制子宫内膜癌的发生[J]. 中国免疫学杂志(WANG C X, XIA M, WANG J, et al. microRNA-29a inhibits occurrence of endometrial cancer through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Chin J Immunol*), 2021, 37(9): 1074-81.
- [31] ADAMS J C. Fascin-1 as a biomarker and prospective therapeutic target in colorectal cancer [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, 15(1): 41-8.
- [32] FENG Y, ZHU J, OU C, et al. MicroRNA-145 inhibits tumour growth and metastasis in colorectal cancer by targeting fascin-1 [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(9): 2300-9.
- [33] KIM S J, KIM D C, KIM M C, et al. Fascin expression is related to poor survival in gastric cancer [J]. *Pathol Int*, 2012, 62(12): 777-84.
- [34] FUSE M, NOHATA N, KOJIMA S, et al. Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1 [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(4): 1093-101.
- [35] 朱琳, 曾庆松, 王续. 微小RNA-145-5p对结肠癌细胞增殖凋亡和FSCN1表达的影响[J]. 临床肿瘤学杂志(ZHU L, ZENG Q S, WANG X. Effect of microRNA-145-5p on proliferation, apoptosis and expression of FSCN1 in colon cancer cells [J]. *Chin Clin Oncol*), 2019, 24(11): 999-1003.
- [36] 李培栋, 王新军, 单峤, 等. RNA干扰Fascin1表达抑制胶质瘤细胞U87MG的侵袭、转移能力[J]. 中国免疫学杂志(LI P D, WANG X J, SHAN Q, et al. Reversal effect of RNA interference targeting Fascin1 on migration and invasion of glioma cell line U87 MG [J]. *Chin J Immunol*), 2015, 31(6): 764-8.