

蛇床子素调节miR-433-3p/Tiam1抑制结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭

王甲正¹ 刘晓园² 张蕾^{2*} 刘盼盼² 陈永学² 陈贺艳² 李东兴²

(¹邯郸市中心医院麻醉科, 邯郸 056001; ²邯郸市中心医院肿瘤科, 邯郸 056001)

摘要 该文旨在探讨蛇床子素调节miR-433-3p/T细胞淋巴瘤侵袭和转移诱导蛋白1(Tiam1)抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的机制。体外培养SW480细胞, 并将其随机分为对照组、蛇床子素低剂量组、蛇床子素高剂量组、miR-433-3p-NC组、蛇床子素高剂量+miR-433-3p抑制剂组。检测各组SW480细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭, 并检测各组SW480细胞Tiam1蛋白表达水平、凋亡与上皮-间质转化相关蛋白表达水平, miR-433-3p及Tiam1 mRNA表达水平。体外培养SW480细胞, 将其随机分为对照组、miR-433-3p mimics组、miR-433-3p mimics+pcDNA组、miR-433-3p mimics+pcDNA-Tiam1组, 分组处理后检测各组SW480细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭情况。结果显示, 与对照组相比, 蛇床子素低剂量组和高剂量组细胞生存率, 集落生成率, 迁移距离, 侵袭数, Tiam1 mRNA及蛋白表达水平, PCNA、Claudin-1与N-cadherin蛋白表达水平均降低($P<0.05$); 增殖倍增时间, 凋亡率与凋亡比例, E-cadherin及caspase-3、Bax蛋白表达水平, miR-433-3p表达水平升高($P<0.05$), 高剂量蛇床子素作用更强; miR-433-3p抑制剂可降低蛇床子素对细胞上述各指标的作用($P<0.05$)。上调miR-433-3p可对结肠癌细胞起到与蛇床子素相同的抗癌作用, 而过表达Tiam1可减弱上调miR-433-3p对结肠癌细胞的抗癌作用。结果表明, 蛇床子素通过促进miR-433-3p表达而下调Tiam1表达, 从而上调E-cadherin及caspase-3、Bax蛋白表达水平, 下调PCNA、Claudin-1与N-cadherin蛋白表达水平, 最终抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭并促使其大量凋亡。

关键词 蛇床子素; miR-433-3p/Tiam1; 结肠癌; 增殖; 迁移; 侵袭

Osthole Regulates miR-433-3p/Tiam1 to Suppress Colon Cancer Cell Proliferation, Migration and Invasion

WANG Jiazheng¹, LIU Xiaoyuan², ZHANG Lei^{2*}, LIU Panpan², CHEN Yongxue², CHEN Heyan², LI Dongxing²

(¹Department of Anesthesiology, Handan Central Hospital, Handan 056001, China;

²Department of Oncology, Handan Central Hospital, Handan 056001, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the mechanism of osthole regulating miR-433-3p/Tiam1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1) to inhibit the proliferation, migration and invasion of colon cancer cells. SW480 cells were cultured *in vitro* and randomly grouped into control group, low-dose osthole group, high-dose osthole group, miR-433-3p-NC control group, and high-dose osthole+miR-433-3p inhibitor group. After grouping treatment, to detect the proliferation, apoptosis, migration and invasion of SW480 cells in each group, and to detect the expressions of Tiam1 protein, the expressions of apoptosis-related proteins and epithelial-mesenchymal transition-related proteins, the expressions of miR-433-3p and Tiam1 mRNA of SW480 cells in each group. SW480 cells were cultured *in vitro* and randomly grouped into control group, miR-433-3p

收稿日期: 2025-03-12

接受日期: 2025-05-13

*通信作者。Tel: 18303029199, E-mail: y66oqw@163.com

Received: March 12, 2025

Accepted: May 13, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-18303029199, E-mail: y66oqw@163.com

mimics group, miR-433-3p mimics+pcDNA group, miR-433-3p mimics+pcDNA-Tiam1 group. After grouping treatment, detect the proliferation, apoptosis, migration and invasion of SW480 cells in each group. The results showed that compared with the control group, the cell survival rate, colony formation rate, migration distance, invasion number, Tiam1 mRNA and protein expressions, PCNA, Claudin-1 and N-cadherin protein expressions in the low- and high-dose osthole groups decreased ($P<0.05$), the proliferation doubling time, apoptosis rate and apoptosis ratio, the E-cadherin and caspase-3, Bax protein expressions, and the miR-433-3p expression increased ($P<0.05$), high dose osthole has a stronger effect; miR-433-3p inhibitor can reduce the effects of osthole on the above-mentioned cellular indicators. Upregulation of miR-433-3p can exert the same anti-cancer effect on colon cancer cells as osthole, while overexpression of Tiam1 can weaken the anti-cancer effect of upregulated miR-433-3p on colon cancer cells. The results suggest that osthole down-regulates the expression of Tiam1 by promoting the expression of miR-433-3p, thereby upregulate E-cadherin and caspase-3, Bax protein expression, downregulate PCNA, Claudin-1 and N-cadherin protein expression, ultimately inhibit the proliferation, migration and invasion of colon cancer cells, and promote their massive apoptosis.

Keywords osthole; miR-433-3p/Tiam1; colon cancer; proliferation; migration; invasion

结肠癌是发病率较高的常见消化系统恶性肿瘤,晚期患者、复发患者及发生转移的患者生存率很低,因此,限制结肠癌的复发转移是改善患者预后的关键^[1-2]。近年来研究表明,微小RNA可调控染色质重构与细胞增殖、凋亡等过程,在癌变中发挥重要调节作用,其中miR-433-3p已被证实与多种癌症形成和恶性进展相关,过表达miR-433-3p可导致胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的抑制^[3],上调miR-433-3p可抑制结肠癌细胞生长增殖和侵袭,发挥抗癌作用^[4],通过查询starbase数据库进行生物信息学分析可知,T细胞淋巴瘤侵袭和转移诱导蛋白1(T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1, Tiam1)可能是miR-433-3p的下游直接作用靶点,在肿瘤发病机制中起到重要作用,敲除Tiam1可抑制胶质母细胞瘤生长和侵袭^[5],并可降低小细胞肺癌细胞的生存能力和致瘤性^[6],还可抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭^[7],由此可知miR-433-3p/Tiam1是防治结肠癌的重要靶点。蛇床子素是来自草本植物蛇床果实的一种天然香豆素类化合物,具有显著抗癌活性,可抑制人肝癌细胞增殖和侵袭^[8],并可通过抑制人胃癌细胞、肺腺癌细胞、乳腺癌细胞及结肠癌细胞生长而发挥抗肿瘤作用^[9],但蛇床子素是否可通过调节miR-433-3p/Tiam1抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭,目前尚不清楚,本文以不同浓度蛇床子素处理人结肠癌细胞株SW480,来对上述问题进行探究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂材料与仪器

人结肠癌细胞SW480购自上海匹拓生物科技有限公司;人正常结肠上皮细胞NCM-460购自上海淳麦生物科技有限公司;一步法反转录荧光定量试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司;空载质粒、Tiam1过表达质粒、miR-433-3p抑制剂、mimics及miR-433-3p阴性对照(miR-433-3p-NC)、miR-433-3p mimics购自苏州吉玛基因股份有限公司;CCK-8细胞活力检测试剂盒、Trizol总RNA提取试剂购自南京建成生物工程研究所有限公司;Hoechst 33258荧光染料、双荧光素酶报告基因检测试剂盒、蛇床子素(纯度:HPLC $\geq$ 98%,货号IO0070)购自北京索莱宝科技有限公司;山羊抗兔IgG二抗、Tiam1兔抗人一抗、caspase-3兔抗人一抗、 β -tubulin兔抗人一抗、Claudin-1兔抗人一抗、PCNA兔抗人一抗、E-cadherin兔抗人一抗、N-cadherin兔抗人一抗、Bax兔抗人一抗、Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒、吉姆萨染色液购自英国Abcam公司等。

Epoch连续波长酶标仪购自美国Bio-Tek公司;ForeQuant F4/F6实时荧光定量PCR仪购自美国Molecular Devices公司;CyFlow[®] Cube 6流式细胞仪购自德国PARTEC公司;DYF-600荧光显微镜购自上海点应光学仪器有限公司;Transilluminator化学发光凝胶成像仪、1658033小型垂直电泳转印系统购自美国Bio-Rad公司等。

1.2 方法

1.2.1 通过CCK-8法筛选蛇床子素合适作用浓度 快速解冻复苏SW480、NCM-460细胞后用DMEM高糖培养基(含有1%青/链霉素+10%胎牛血清)培养,蛇床子素以DMEM高糖培养基溶解后制为4 mg/mL的储备液备用。将SW480、NCM-460细胞传代后以 1×10^4 /孔的密度接种在96孔板,生长(5% CO₂、37 °C) 24 h,分别以终浓度0、2.5、5、10、20、40 μg/mL蛇床子素处理24 h^[10],采用CCK-8试剂孵育(5% CO₂、37 °C)细胞2 h,然后以酶标仪测定各处理组细胞吸光度(*D*)值后计算其生存率(记为*R*),公式: $R = D_{\text{药物干预组}} / D_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.2.2 分组处理细胞及收集标本 SW480细胞传代后以 1×10^5 /孔的密度接种在24孔板,生长(5% CO₂、37 °C) 24 h,将其随机分为对照组、蛇床子素低剂量组、蛇床子素高剂量组、miR-433-3p-NC组、蛇床子素高剂量+miR-433-3p抑制剂组,对照组细胞不做任何处理,蛇床子素低剂量组、蛇床子素高剂量组细胞分别以终浓度10、20 μg/mL的蛇床子素处理,蛇床子素高剂量+miR-433-3p抑制剂组以终浓度20 μg/mL的蛇床子素处理的同时用脂质体2000转染miR-433-3p抑制剂,miR-433-3p-NC组转染miR-433-3p-NC,24 h后收集细胞进行后续检测。

1.2.3 检测各组细胞增殖与凋亡 平板集落形成实验:收集1.2.2中分组处理后的SW480细胞洗涤后制备为单细胞悬液,每组取500个细胞接种在无菌培养皿中培养(5% CO₂、37 °C) 3周,以PBS洗涤、4%多聚甲醛37 °C固定2 h,行吉姆萨染色(37 °C、10 min),光镜下观察细胞集落形成并定量各组集落数(记为*N*),算出各组集落生成率(记为*C*),公式: $C = N_{\text{实验处理组}} / N_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

SW480细胞传代后以 5×10^4 /孔的密度接种在24孔板中培养(5% CO₂、37 °C),按“1.2.2”中方法分组处理24 h后用细胞计数板对各组细胞进行计数并计为第1天,连续计数7天后绘制细胞生长曲线,依据Patterson公式计算细胞增殖倍增时间(记为*H*),公式: $H = T \times \log_2 / (\log N_1 - \log N_0)$, *N*₀表示初始细胞数, *N*₁表示终末细胞数, *T*指*N*₀到*N*₁的时间。

CCK-8法: SW480细胞传代后以 1×10^4 /孔的密度接种在96孔板中生长(5% CO₂、37 °C) 24 h,以1.2.2中方法分组处理24 h后依照1.2.1中CCK-8法检测各组细胞生存率。

对1.2.2中分组处理后的SW480细胞进行PBS洗涤、4%多聚甲醛37 °C固定2 h处理,行Hoechst 33258染色(37 °C、10 min),然后于荧光显微镜下观察各组细胞形态并定量其凋亡比例。

对1.2.2中分组处理后的SW480细胞进行PBS洗涤后制为单细胞悬液,计数后每组取约 5×10^5 个细胞加入500 μL结合缓冲液进行重悬,加入5 μL Annexin V-FITC和2.5 μL PI,避光下进行双染(37 °C、10 min),流式上机后采用流式细胞仪测定各组细胞凋亡率。

1.2.4 检测各组细胞迁移侵袭 收集1.2.2中分组处理后的SW480细胞洗涤后制备单细胞悬液,每组取 1×10^5 个细胞接种在24孔培养板中生长(5% CO₂、37 °C) 24 h,于每孔中间划直线,镜下观察并拍照、定量划痕宽度,继续培养(5% CO₂、37 °C) 24 h后再次拍照、定量划痕宽度,计算各组迁移距离。

1.2.2中分组处理后的SW480细胞洗涤后制为单细胞悬液,每组取 1×10^5 个细胞接种在用基底胶包被过的Transwell培养板上室,上室细胞用无血清培养基培养同时于下室加适量含10%血清的培养基,培养(5% CO₂、37 °C) 24 h后对下室新行吉姆萨染色(37 °C、10 min),镜下观察、拍照后定量各组细胞侵袭数。

1.2.5 检测各组细胞Tiam1、PCNA、caspase-3、Bax、Claudin-1、N-cadherin、E-cadherin蛋白表达情况 收集1.2.2中分组处理24 h后的SW480细胞,用RIPA裂解、提取其中总蛋白后测定其浓度,每组取20 μg总蛋白变性(100 °C、5 min)后上样,电泳分离(120 V、80 min),湿转(110 V、75 min),封闭蛋白非特异抗原位点(3%牛血清白蛋白,37 °C、2 h),截下N-cadherin、Tiam1、Claudin-1、caspase-3、Bax、E-cadherin、β-tubulin,进行一抗、二抗孵育及洗涤、显色等系列操作,一抗稀释比例为N-cadherin(1:1 000)、Tiam1(1:1 000)、Claudin-1(1:1 000)、caspase-3(1:2 000)、Bax(1:2 000)、E-cadherin(1:1 000)、β-tubulin(1:2 000),二抗稀释比例为1:2 000,拍照后定量各组蛋白灰度值,以β-tubulin为内参量化各组N-cadherin、Tiam1、Claudin-1、caspase-3、Bax、E-cadherin蛋白相对表达,对分子量相近的蛋白(如PCNA和caspase-3、Claudin-1和Bax、N-cadherin和E-cadherin)进行检测时,于PCNA、Claudin-1、N-cadherin蛋白拍照后用洗脱液洗脱相对应的一抗和二抗,然后孵育分子量相近的caspase-3、Claudin-1、E-cadherin蛋白相应一抗,用

表1 基因引物序列
Table 1 Gene primer sequence

引物名称 Primers	方向 Direction	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
miR-433-3p	F	GGA GAA GTA CGG TGA GCC TGT
	R	GAA CAC CGA GGA GCC CAT CAT
U6	F	CTC GCT TCG GCA GCA CA
	R	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT
Tiam1	F	AGA TGG CAA GAG GGA GAA AGA AG
	R	GAC AGA ACC AGG ATG GAG TGA AAT AC
β -actin	F	ACT CTT CCA GCC TTC CTT CCT
	R	ACT CGT CAT ACT CCT GCT TGC T

同样方法进行抗体孵育、蛋白显色、拍照操作。

1.2.6 检测各组细胞 miR-433-3p、Tiam1 mRNA 表达水平 收集1.2.2中分组处理后的SW480细胞,用Trizol提取其中总RNA后以一步法做PCR扩增,具体反应体系配制及反应条件设定参照一步法反转录荧光定量试剂盒说明书进行操作(miR-433-3p内参为U6, Tiam1内参为 β -actin),各组基因循环阈值以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法分析量化得到其相对表达,基因引物序列见表1。

1.2.7 SW480细胞中 miR-433-3p对Tiam1靶向调控的验证 取传代2次的SW480细胞传代后以 1×10^5 /孔的密度接种在24孔板中,生长24 h后将其随机分为Tiam1突变+miR-433-3p-NC组、Tiam1突变+miR-433-3p mimics组、Tiam1野生+miR-433-3p-NC组、Tiam1野生+miR-433-3p mimics组,将突变型、野生型Tiam1 3'-UTR报告质粒分别和miR-433-3p mimics、miR-433-3p-NC两两联合转染入SW480细胞中,24 h后用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定各组细胞双荧光素酶活性并量化其相对值。

1.2.8 检测 miR-433-3p/Tiam1对SW480细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的调控作用 SW480细胞传代后以 1×10^5 /孔的密度接种在24孔板中生长(5% CO₂、37 °C) 24 h,将其随机分为对照组、miR-433-3p mimics组、miR-433-3p mimics+pcDNA组、miR-433-3p mimics+pcDNA-Tiam1组,对照组细胞不做任何处理,miR-433-3p mimics组细胞转染miR-433-3p mimics,miR-433-3p mimics+pcDNA组细胞联合转染miR-433-3p mimics和空载质粒,miR-433-3p mimics+pcDNA-Tiam1组细胞联合转染miR-433-3p mimics和Tiam1过表达质粒,24 h后采用“1.2.3”中CCK-8和平板集落形成实验方法测定各组细胞生存率、集落生成率,采用“1.2.3”中Hoechst 33258染色

方法检测各组细胞凋亡率,采用“1.2.4”中细胞划痕实验方法检测各组细胞迁移距离,采用“1.2.4”中Transwell实验方法检测各组细胞侵袭数。

1.3 数据分析

本研究所得数据都是计量资料,用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并以GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析,多组间差异比较采用单因素方差分析,两两之间进一步差异比较行SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蛇床子素作用浓度确定

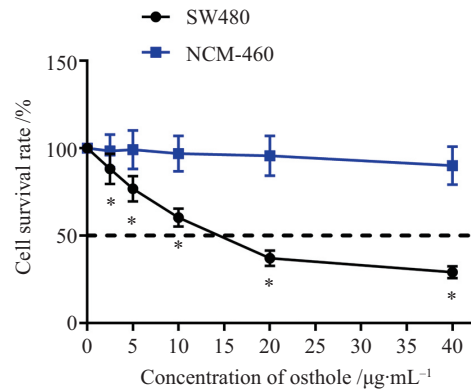
SW480细胞生存率在不同浓度蛇床子素处理下均可降低,10 μ g/mL、20 μ g/mL接近蛇床子素的IC₅₀值,且10 μ g/mL、20 μ g/mL蛇床子素对NCM-460细胞无毒性作用,因而本文选择10 μ g/mL、20 μ g/mL的蛇床子素进行后续实验。见图1。

2.2 蛇床子素对SW480细胞增殖的影响

蛇床子素低、高剂量组细胞增殖倍增时间、生存率、集落生成率相比对照组均降低($P < 0.05$);蛇床子素高剂量组细胞增殖倍增时间、生存率、集落生成率相比蛇床子素低剂量组降低($P < 0.05$)。蛇床子素高剂量+miR-433-3p抑制剂组细胞增殖倍增时间、生存率、集落生成率相比蛇床子素高剂量组升高($P < 0.05$)。见图2、图3和表2。

2.3 蛇床子素对SW480细胞凋亡、迁移和侵袭的影响

蛇床子素低、高剂量组细胞迁移距离、侵袭数相比对照组均降低($P < 0.05$),凋亡率、凋亡比例升高($P < 0.05$);蛇床子素高剂量组细胞迁移距离、侵袭数相比蛇床子素低剂量组降低($P < 0.05$),凋亡率、调



$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 蛇床子素相比。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with 0 $\mu\text{g/mL}$ osthole.

图1 不同浓度蛇床子素对SW480与NCM-460细胞生存率的影响

Fig.1 The effect of different concentrations of osthole on the survival rate of SW480 and NCM-460 cells

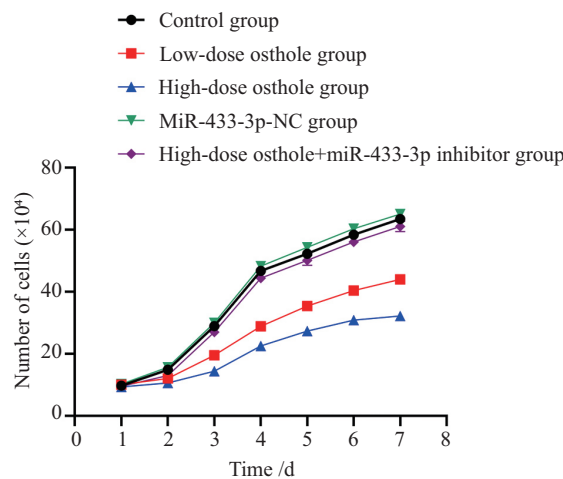


图2 蛇床子素对SW480细胞生长曲线的影响

Fig.2 The effect of osthole on the growth curves of SW480 cells

亡比例升高($P<0.05$)。蛇床子素高剂量+miR-433-3p抑制剂组细胞迁移距离、侵袭数相比蛇床子素高剂量组升高($P<0.05$), 凋亡率、凋亡比例降低($P<0.05$)。见图4~图7、表3。

2.4 蛇床子素对SW480细胞增殖、凋亡及上皮-间质转化相关蛋白表达的影响

蛇床子素低、高剂量组细胞PCNA、N-cadherin、Claudin-1蛋白表达水平相比对照组均降低($P<0.05$), Bax、caspase-3、E-cadherin蛋白表达水平升高($P<0.05$); 蛇床子素高剂量组细胞PCNA、N-cadherin、Claudin-1蛋白表达水平相比蛇床子素低剂量组降低($P<0.05$), Bax、caspase-3、E-cadherin蛋白表达水平升高($P<0.05$)。蛇床子素高剂量+miR-433-3p抑制剂组细胞PCNA、N-cadherin、Claudin-1蛋白表达水平相比蛇床子素高剂量组升高($P<0.05$), Bax、

caspase-3、E-cadherin蛋白表达水平降低($P<0.05$)。见图8。

2.5 蛇床子素对SW480细胞miR-433-3p/Tiam1表达的影响

蛇床子素低、高剂量组细胞miR-433-3p表达水平相比对照组均升高($P<0.05$), Tiam1 mRNA及蛋白表达水平降低($P<0.05$); 蛇床子素高剂量组细胞miR-433-3p表达水平相比蛇床子素低剂量组升高($P<0.05$), Tiam1 mRNA及蛋白表达水平降低($P<0.05$)。蛇床子素高剂量+miR-433-3p抑制剂组细胞miR-433-3p表达水平相比蛇床子素高剂量组降低($P<0.05$), Tiam1 mRNA及蛋白表达水平升高($P<0.05$)。见图9和表4。

2.6 SW480细胞中miR-433-3p对Tiam1的靶向调控

miR-433-3p和Tiam1间结合位点通过查询 star-

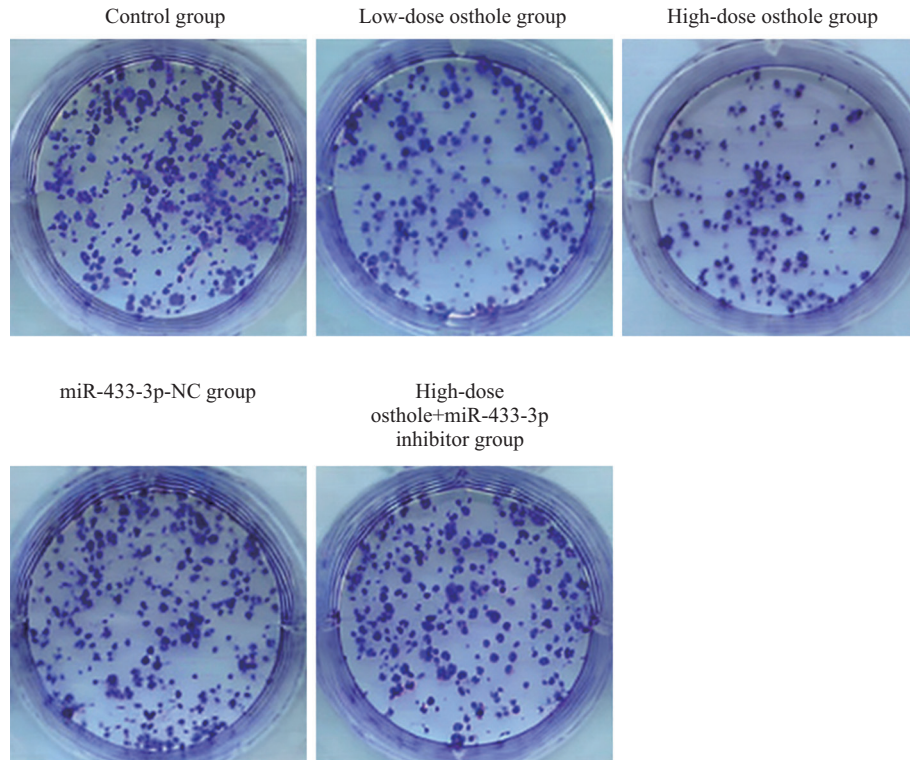


图3 吉姆萨染色分析各组SW480细胞集落生成

Fig.3 Giemsa staining was used to analyze the colony formation of SW480 cells in each group

表2 蛇床子素降低SW480细胞增殖倍增时间、生存率、集落生成率

Table 2 Osthole reduces the proliferation doubling time, survival rate, and colony formation rate of SW480 cells

组别 Group	增殖倍增时间/h Proliferation doubling time /h	生存率/% Survival rate /%	集落生成率/% Colony formation rate /%
Control group	33.46±0.62	100.00±0.00	100.00±0.00
Low-dose osthole group	37.71±0.58*	65.78±7.84*	68.83±7.33*
High-dose osthole group	42.65±0.70* [#]	37.23±5.11* [#]	39.75±4.15* [#]
MiR-433-3p-NC group	33.12±0.54	95.82±16.50	97.15±16.13
High-dose osthole+miR-433-3p inhibitor group	34.03±0.73 ^{&}	91.96±19.17 ^{&}	92.46±15.84 ^{&}

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与对照组相比; [#] $P<0.05$, 与蛇床子素低剂量组相比; [&] $P<0.05$, 与蛇床子素高剂量组相比。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with the control group; [#] $P<0.05$ compared with the low-dose osthole group; [&] $P<0.05$ compared with the high-dose osthole group.

base数据库可得, 见图10。Tiam1野生+miR-433-3p mimics组相对荧光素酶活性相比Tiam1野生+miR-433-3p-NC组降低($P<0.05$); Tiam1突变+miR-433-3p-NC组相对荧光素酶活性相比Tiam1突变+miR-433-3p mimics组无明显差异($P>0.05$)。见表5。

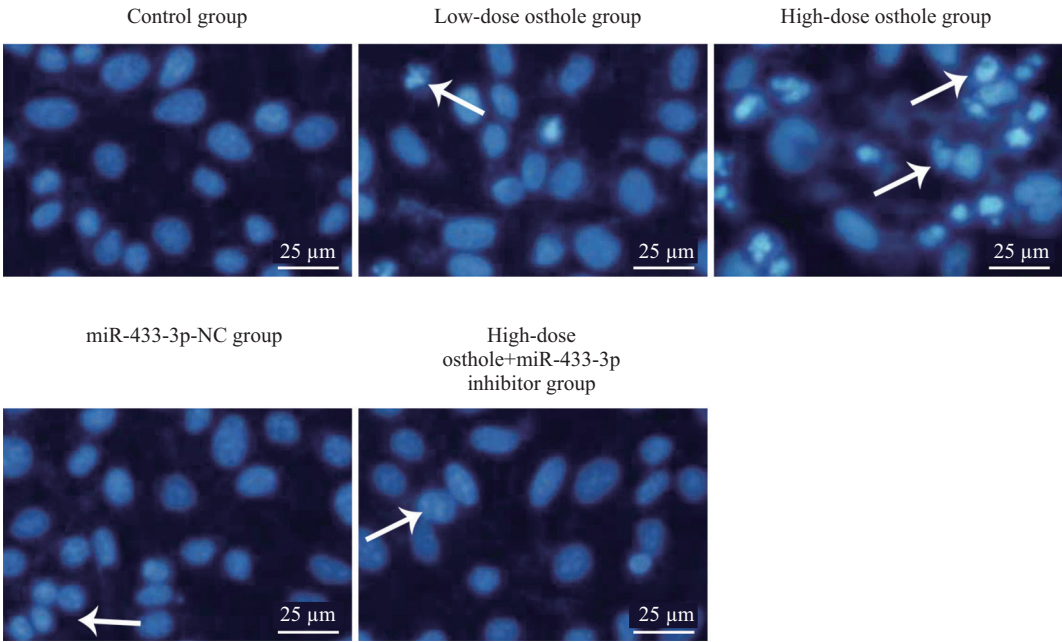
2.7 miR-433-3p/Tiam1对SW480细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的调控作用

miR-433-3p mimics组、miR-433-3p mimics+pcDNA组细胞增殖倍增时间、生存率、集落生成率、迁移距离、侵袭数相比对照组均降低

($P<0.05$), 凋亡率、凋亡比例升高($P<0.05$)。miR-433-3p mimics+pcDNA-Tiam1组细胞增殖倍增时间、生存率、集落生成率、迁移距离、侵袭数相比miR-433-3p mimics组升高($P<0.05$), 凋亡率、凋亡比例降低($P<0.05$)。见图11~图16和表6。

3 讨论

我国结肠癌发病率不断升高, 且发病人群趋于年轻化, 如今虽然增加了生物靶向治疗、免疫治疗等新型治疗手段, 但晚期转移患者与复发患者仍预



箭头指示凋亡细胞。
Arrows indicate apoptotic cells.

图4 Hoechst 33258染色分析各组SW480细胞凋亡情况
Fig.4 Hoechst 33258 staining was used to analyze the apoptosis of SW480 cells in each group

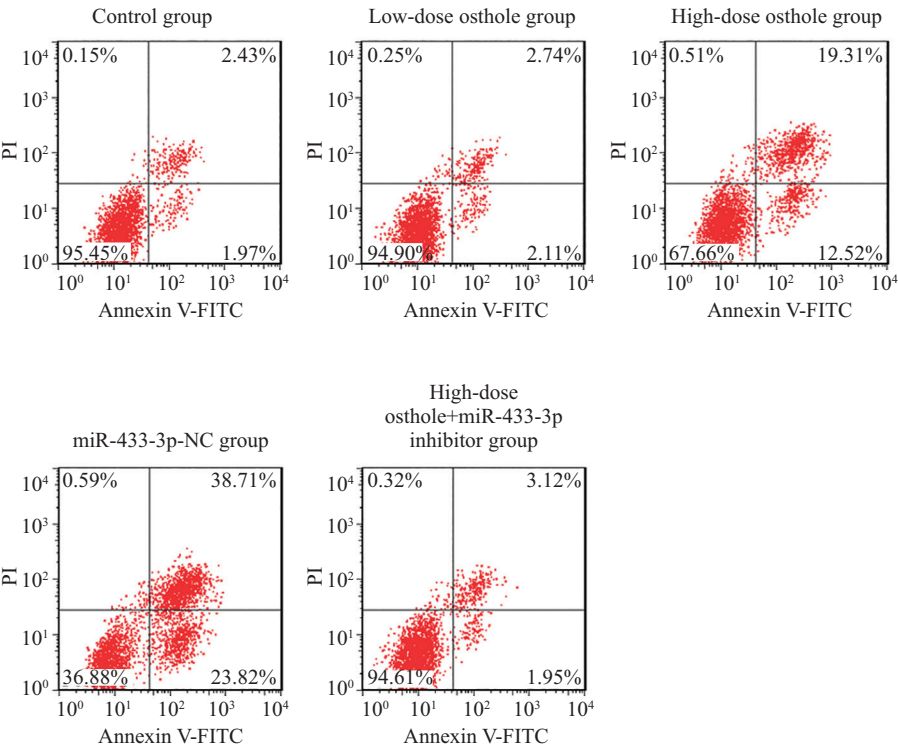


图5 流式细胞实验分析SW480细胞凋亡
Fig.5 Flow cytometry assay was used to analyze the apoptosis of SW480 cells in each group

后不佳，因此，深入探究结肠癌发病机制并积极寻找新型治疗靶点临床意义重大^[11-12]。蛇床子素提取自中药材蛇床子，具有广泛抗肿瘤作用，可通过抑

制自噬促进人舌鳞癌细胞凋亡^[13]，抑制卵巢癌、结肠癌细胞增殖^[9,14]，还能通过促使免疫细胞浸润治疗乳腺癌^[15]，本文以不同浓度蛇床子素处理体外培养

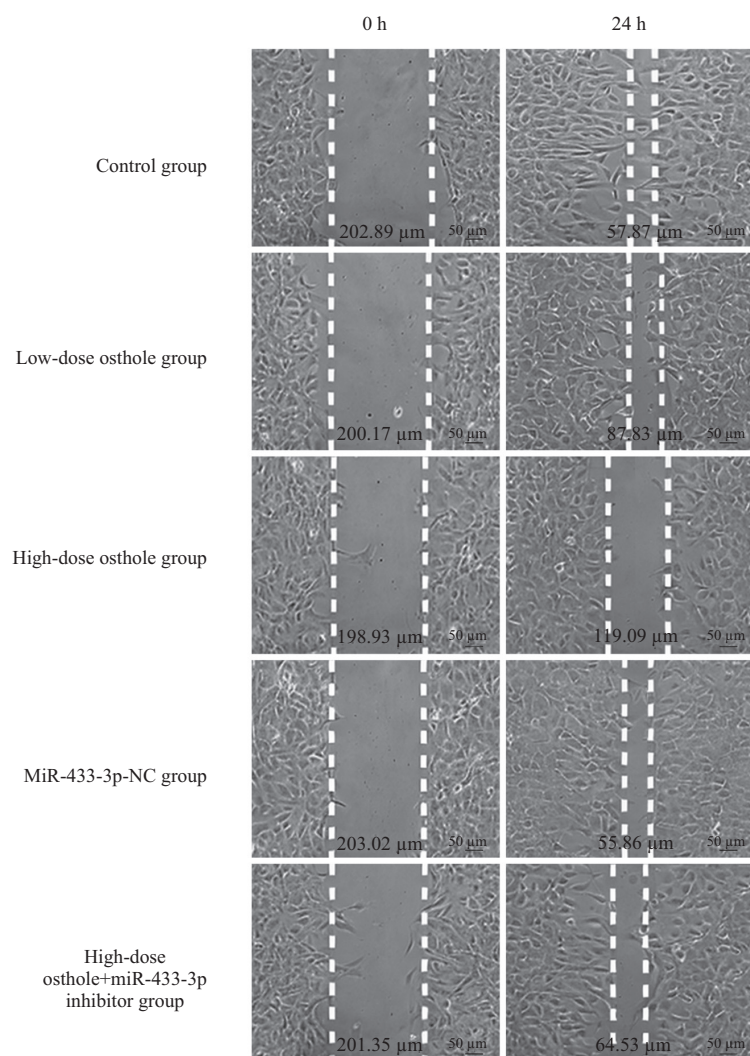


图6 划痕实验分析各组SW480细胞迁移

Fig.6 Scratch assay was used to analyze the migration of SW480 cells in each group

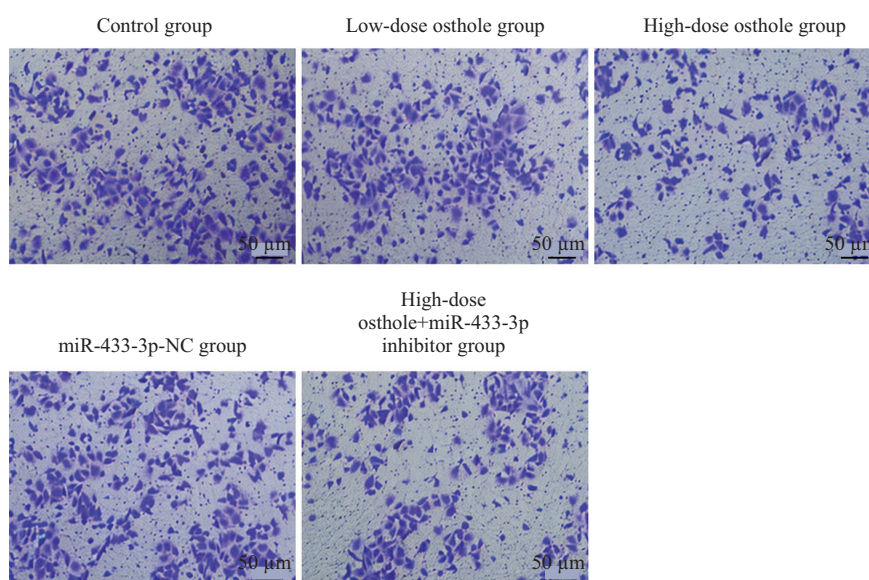


图7 Transwell实验分析SW480细胞侵袭情况

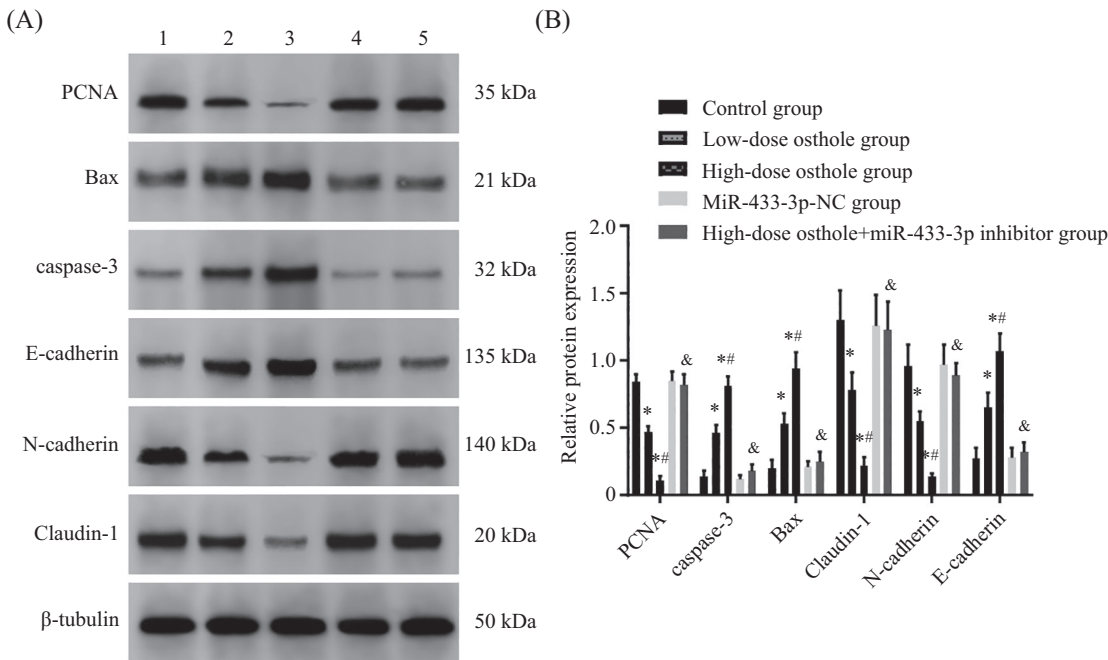
Fig.7 Transwell experiment was used to analyze the invasion of SW480 cells in each group

表3 蛇床子素对SW480细胞凋亡率、凋亡比例、迁移距离、侵袭数的影响

Table 3 The effect of osthole on apoptosis rate, apoptosis ratio, migration distance and invasion number of SW480 cells

组别 Group	凋亡率/% Apoptosis rate /%	凋亡比例/% Apoptosis ratio /%	迁移距离/ μm Migration distance / μm	侵袭数 Invasion number
Control group	4.69 $\pm$ 0.95	3.97 $\pm$ 1.25	145.02 $\pm$ 14.24	245.50 $\pm$ 33.48
Low-dose osthole group	30.78 $\pm$ 3.43*	32.01 $\pm$ 2.92*	112.34 $\pm$ 8.13*	164.50 $\pm$ 18.64*
High-dose osthole group	61.54 $\pm$ 9.82**	58.42 $\pm$ 4.25**	79.84 $\pm$ 5.96**	81.00 $\pm$ 10.39**
MiR-433-3p-NC group	5.01 $\pm$ 1.04	3.63 $\pm$ 1.16	147.16 $\pm$ 13.60	235.00 $\pm$ 31.07
High-dose osthole+miR-433-3p inhibitor group	6.32 $\pm$ 1.96 ^{&}	5.14 $\pm$ 1.67 ^{&}	136.82 $\pm$ 12.04 ^{&}	232.50 $\pm$ 37.21 ^{&}

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与对照组相比; ** $P<0.05$, 与蛇床子素低剂量组相比; [&] $P<0.05$, 与蛇床子素高剂量组相比。
 $\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with the control group; ** $P<0.05$ compared with the low-dose osthole group; [&] $P<0.05$ compared with the high-dose osthole group.



A: 免疫印迹分析各组SW480细胞凋亡及上皮-间质转化相关蛋白表达情况。B: 半定量分析各组SW480细胞凋亡及上皮-间质转化相关蛋白表达水平。1: 对照组; 2: 蛇床子素低剂量组; 3: 蛇床子素高剂量组; 4: miR-433-3p-NC组; 5: 蛇床子素高剂量+miR-433-3p抑制剂组。 $\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与对照组相比; ** $P<0.05$, 与蛇床子素低剂量组相比; [&] $P<0.05$, 与蛇床子素高剂量组相比。

A: immunoblotting was used to analyze the expression of apoptosis and epithelial mesenchymal transition related proteins of SW480 cells in each group. B: semi quantitative analysis of protein expression levels related to apoptosis and epithelial mesenchymal transitions of SW480 cells in each group. 1: control group; 2: low-dose osthole group; 3: high-dose osthole group; 4: miR-433-3p-NC group; 5: high-dose osthole+miR-433-3p inhibitor group. $\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with the control group; ** $P<0.05$ compared with the low-dose osthole group; [&] $P<0.05$ compared with the high-dose osthole group.

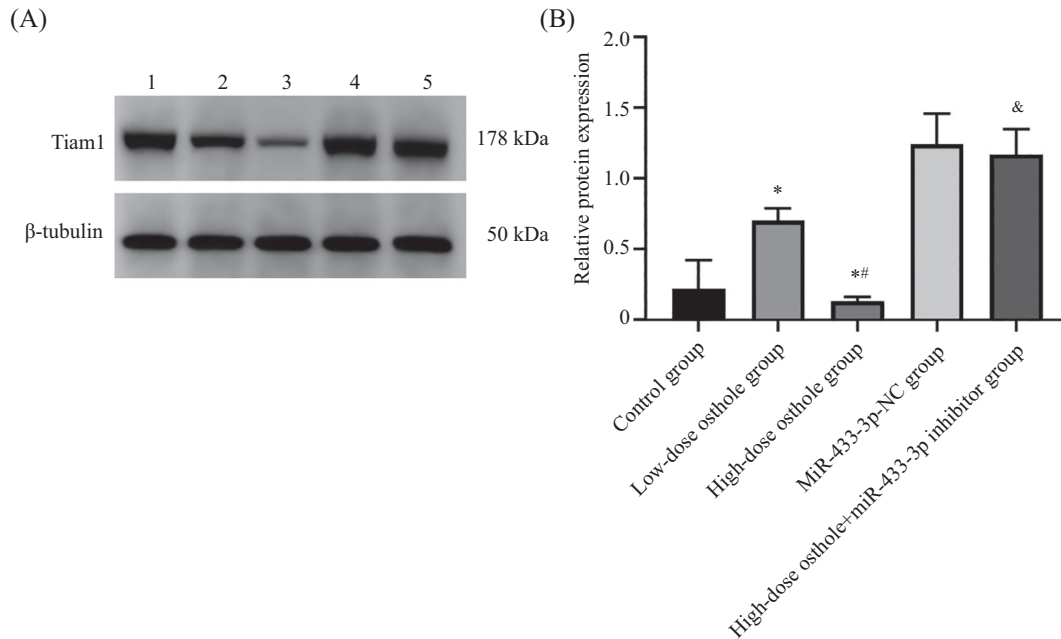
图8 蛇床子素对SW480细胞凋亡及上皮-间质转化相关蛋白表达的影响

Fig.8 The effect of osthole on the expression of apoptosis and epithelial mesenchymal transition related proteins in SW480 cells in each group

的人结肠癌细胞株SW480, 均可下调PCNA、Claudin-1与N-cadherin蛋白表达水平, 升高E-cadherin及caspase-3、Bax蛋白表达水平, 表明蛇床子素可下调增殖与间充质细胞标志蛋白表达, 上调促凋亡与上皮细胞标志蛋白表达, 进而抑制结肠癌细胞上皮-间充质转化、增殖、迁移与侵袭, 并诱导其大量凋亡, CCK-8法、平板集落形成、Hoechst 33258染色等细

胞功能实验结果证实了上述结论, 最终本研究进一步证实了蛇床子素可抑制结肠癌细胞生长及恶性进展, 发挥明显抗癌功效。

miR-433-3p在调节肿瘤细胞生长及恶性表型方面起着重要作用, 在食管鳞状细胞中表现出抗增殖、抗迁移和抗侵袭能力^[16], 上调miR-433-3p可抑制非小细胞肺癌耐药性和恶性进展^[17], 还可抑制骨肉瘤



A: 免疫印迹分析各组SW480细胞Tiam1蛋白表达。B: 半定量分析各组SW480细胞Tiam1蛋白表达水平。1: 对照组; 2: 蛇床子素低剂量组; 3: 蛇床子素高剂量组; 4: miR-433-3p-NC组; 5: 蛇床子素高剂量+miR-433-3p抑制剂组。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与蛇床子素低剂量组相比; & $P<0.05$, 与蛇床子素高剂量组相比。

A: immunoblotting was used to analyze Tiam1 protein expression of SW480 cells in each group. B: semi quantitative analysis of Tiam1 protein expression levels of SW480 cells in each group. 1: control group; 2: low-dose osthole group; 3: high-dose osthole group; 4: miR-433-3p-NC group; 5: high-dose osthole+miR-433-3p inhibitor group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with the control group; # $P<0.05$ compared with the low-dose osthole group; & $P<0.05$ compared with the high-dose osthole group.

图9 蛇床子素对各组SW480细胞Tiam1蛋白表达的影响

Fig.9 The effect of osthole on Tiam1 protein expression in SW480 cells of each group

表4 蛇床子素对SW480细胞miR-433-3p、Tiam1 mRNA相对表达水平的影响

Table 4 The effect of osthole on the relative expression levels of miR-433-3p and Tiam1 mRNA of SW480 cells

组别 Group	miR-433-3p/U6	Tiam1/ β -actin
Control group	1.02±0.16	1.06±0.12
Low-dose osthole group	1.71±0.23*	0.75±0.08*
High-dose osthole group	2.28±0.30*#	0.39±0.09*#
MiR-433-3p-NC group	1.03±0.14	1.04±0.15
High-dose osthole+miR-433-3p inhibitor group	1.09±0.20&	0.99±0.16&

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与蛇床子素低剂量组相比; & $P<0.05$, 与蛇床子素高剂量组相比。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with the control group; # $P<0.05$ compared with the low-dose osthole group; & $P<0.05$ compared with the high-dose osthole group.

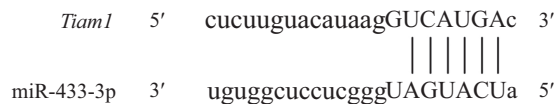


图10 miR-433-3p和Tiam1之间的结合位点

Fig.10 The binding site between miR-433-3p and Tiam1

细胞侵袭^[18], 并通过抑制上皮-间充质转化和细胞增殖对结肠癌发挥抗癌功能^[4], 查询 starbase 数据库发现 miR-433-3p 和 Tiam1 间有结合位点, 推测 Tiam1 可能是 miR-433-3p 的下游直接作用靶点, 且研究显

示, Tiam1 作为一种促进癌细胞迁移和侵袭特性的癌基因在多种肿瘤中高表达^[19], 敲低 Tiam1 表达, 可抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭^[7,20], 因此 miR-433-3p/Tiam1 可作为结肠癌的重要防治靶点, 本文结果

表5 各组SW480细胞相对荧光素酶活性值比较

Table 5 Comparison of relative luciferase activity values of SW480 cells in each group

组别 Group	相对荧光素酶活性 Relative luciferase activity values
Tiam1 wild+miR-433-3p-NC group	1.04±0.12
Tiam1 wild+miR-433-3p mimics group	0.33±0.05*
Tiam1 mutation+miR-433-3p-NC group	0.96±0.15
Tiam1 mutation+miR-433-3p mimics group	0.97±0.13

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与Tiam1野生+miR-433-3p-NC组比较。
 $\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with the Tiam1 wild+miR-433-3p-NC group.

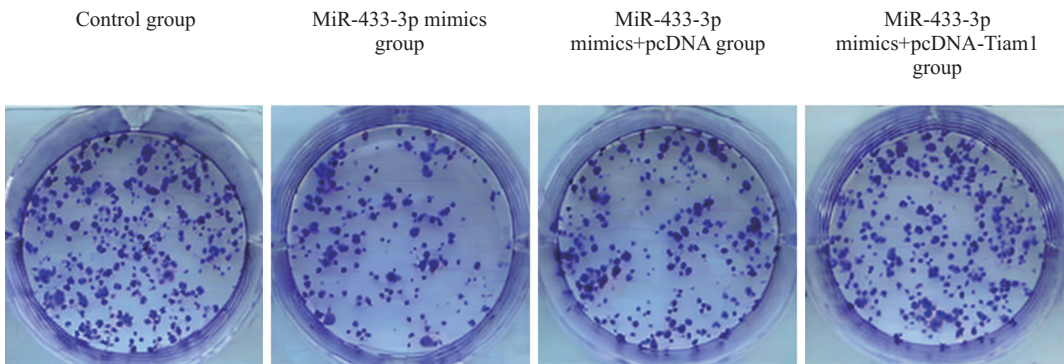


图11 吉姆萨染色分析SW480细胞集落生成

Fig.11 Giemsa staining was used to analyze the colony formation of SW480 cells

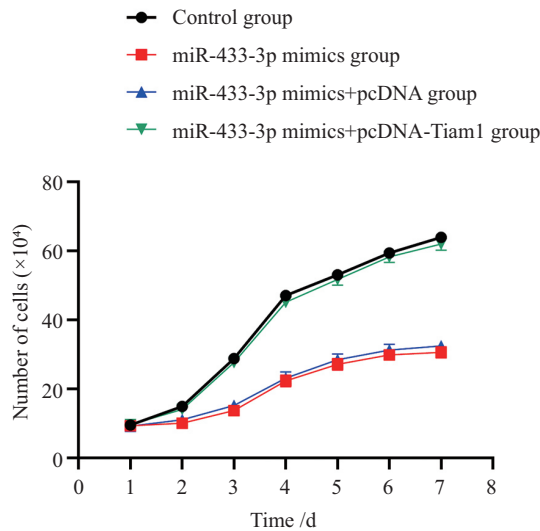
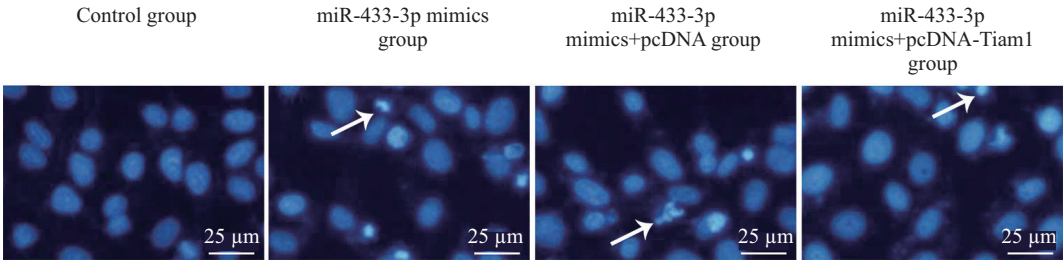


图12 蛇床子素对各组SW480细胞生长曲线的影响

Fig.12 The effect of osthole on the growth curves of SW480 cells in each group

显示,以不同浓度蛇床子素处理体外培养的人结肠癌细胞株SW480,均可升高miR-433-3p表达水平,降低Tiam1 mRNA及蛋白表达水平,且双荧光素酶报告基因实验结果表明miR-433-3p可靶向调控SW480细胞Tiam1,表明miR-433-3p可通过靶向调控Tiam1参与介导蛇床子素对结肠癌增殖、迁移和侵袭的抑制过程。以蛇床子素和miR-433-3p抑制剂联合处理

SW480细胞,相比蛇床子素单独处理,可升高细胞生存率、集落生成率、迁移距离、侵袭数、Tiam1 mRNA表达,上调Tiam1、PCNA、Claudin-1、N-cadherin蛋白表达;同时可降低细胞增殖倍增时间、凋亡率、凋亡比例,下调E-cadherin、caspase-3、Bax蛋白表达水平、miR-433-3p表达水平,表明下调miR-433-3p可减弱蛇床子素对结肠癌细胞增殖与间



箭头指示凋亡细胞。
Arrows indicate apoptotic cells.

图13 Hoechst 33258染色分析SW480细胞凋亡

Fig.13 Hoechst 33258 staining was used to analyze the apoptosis of SW480 cells

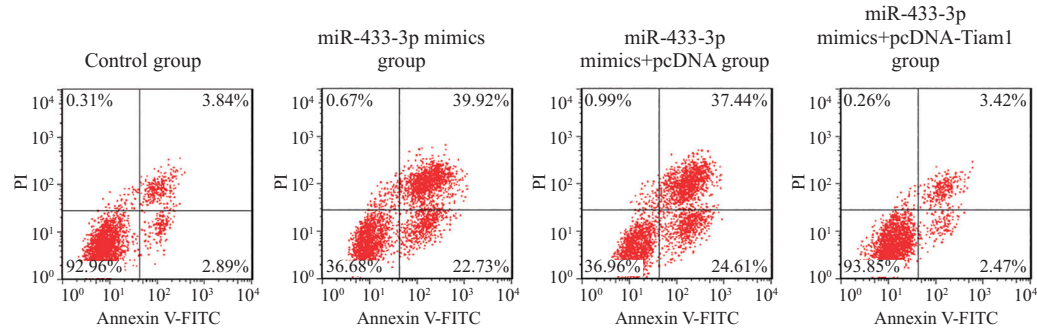


图14 流式细胞实验分析SW480细胞凋亡

Fig.14 Flow cytometry assay was used to analyze the apoptosis of SW480 cells

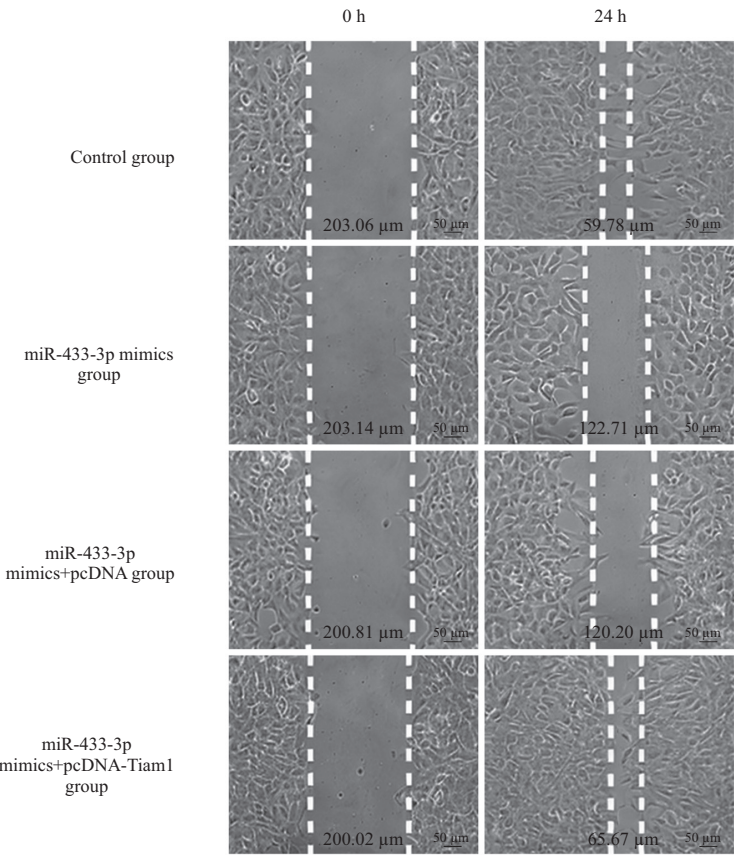


图15 划痕实验分析SW480细胞迁移

Fig.15 Scratch assay was used to analyze the migration of SW480 cells

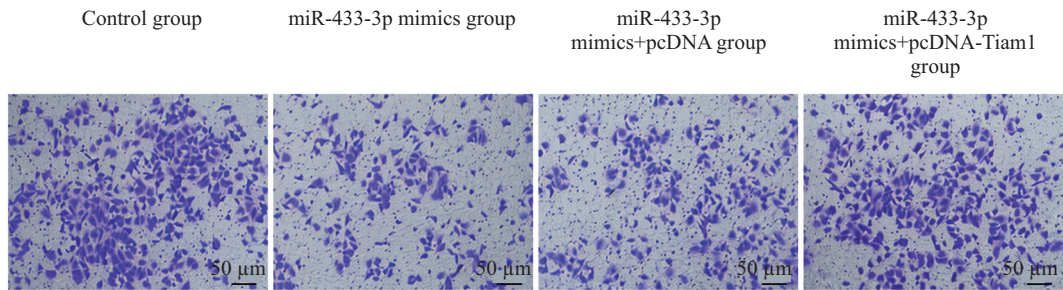


图16 Transwell实验分析SW480细胞侵袭

Fig.16 Transwell experiment was used to analyze the invasion of SW480 cell

表6 蛇床子素对各组SW480细胞增殖倍增时间、生存率、集落生成率、凋亡率、凋亡比例、迁移距离与侵袭数的影响

Table 6 The effect of osthole on the proliferation doubling time, survival rate, colony formation rate, apoptosis rate, apoptosis ratio, migration distance, and invasion number of SW480 cells in each group

组别 Group	增殖倍增时间/h Proliferation doubling time /h	生存率/% Survival rate /%	集落生成率/% Colony formation rate /%	凋亡率/% Apoptosis rate /%	凋亡比例/% Apoptosis ratio /%	迁移距离/μm Migration distance /μm	侵袭数 Invasion number
Control group	33.46±0.62	100.00±0.00	100.00±0.00	4.30±1.06	5.62±1.14	143.28±11.43	248.00±32.95
MiR-433-3p mimics group	37.71±0.58*	43.62±5.07*	45.20±4.80*	62.05±3.14*	60.43±2.91*	80.43±9.95*	82.50±23.10*
MiR-433-3p mimics+pcDNA group	42.65±0.70*	45.84±6.10*	47.50±5.35*	60.51±2.92*	58.01±3.06*	82.61±12.04*	85.00±21.76*
MiR-433-3p mimics+pcDNA-Tiam1 group	33.12±0.54 [#]	92.13±6.75 [#]	93.10±5.80 [#]	5.76±1.53 [#]	7.27±2.30 [#]	134.35±10.68 [#]	223.50±27.25 [#]

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与对照组相比; [#] $P<0.05$, 与miR-433-3p mimics组相比。

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with the control group; [#] $P<0.05$ compared with the miR-433-3p mimics group.

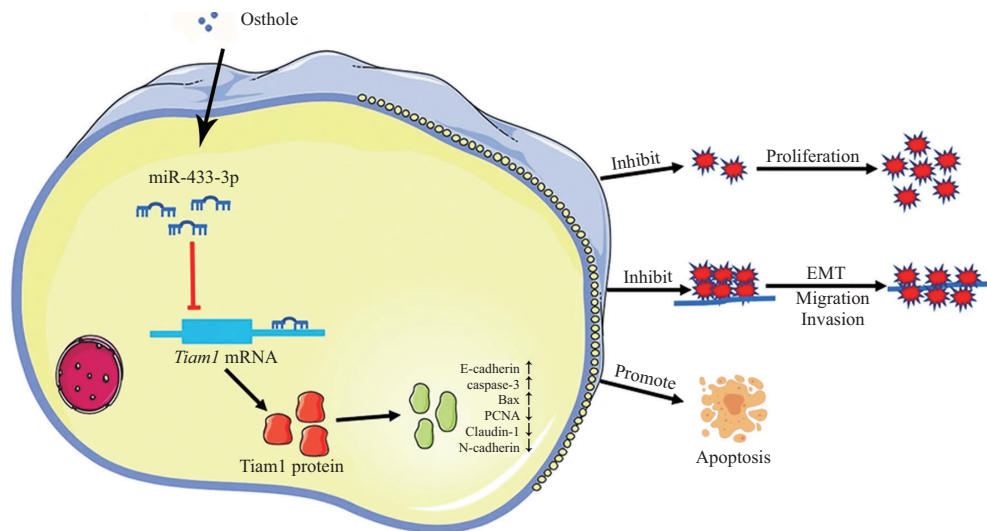


图17 蛇床子素调节miR-433-3p/Tiam1抑制结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭的机制图

Fig.17 Mechanism diagram of osthole inhibiting the proliferation, migration, and invasion of colon cancer cells by regulating miR-433-3p/Tiam1

充质细胞标志蛋白表达的下调以及对促凋亡与上皮细胞标志蛋白表达的上调作用,进而消除其对结肠癌细胞迁移、侵袭和上皮-间充质转化的抑制作用,拮抗其抗增殖、促凋亡功能,最终逆转蛇床子素对结肠癌的抗癌作用;另外本研究结果还显示,以miR-433-3p mimics上调SW480细胞miR-433-3p,可对结

肠癌细胞起到与蛇床子素相同的抗癌作用,而在上调SW480细胞中miR-433-3p的同时过表达Tiam1,可减弱上调miR-433-3p对结肠癌细胞的抗癌作用,最终揭示蛇床子素抑制结肠癌细胞增殖、上皮-间充质转化、迁移和侵袭的药理机制是通过上调miR-433-3p而降低Tiam1表达水平。

综上所述,蛇床子素可通过促使miR-433-3p表达而下调Tiam1,从而抑制结肠癌细胞上皮-间充质转化,降低其迁移侵袭活性,对其起到促凋亡及抗增殖作用,调控miR-433-3p/Tiam1表达是其分子机制之一。本文证实了蛇床子素可对结肠癌起到明显的抗癌作用,并初步探究了其作用机制,这不仅有利于全面阐释结肠癌发病机制,还为其临床筛查、防治提供了新的作用靶点及备选药物,有助于其治疗方法的改进。

参考文献 (References)

- [1] HAKKI L, KHAN A, DO E, et al. Tumour deposits are independently associated with recurrence in colon cancer [J]. *Colorectal Dis*, 2024, 26(3): 459-65.
- [2] BIRGISSON H, OLAFSDOTTIR E J, SVERRISDOTTIR A, et al. Screening for cancer of the colon and rectum A review on incidence, mortality, cost and benefit [J]. *Laeknabladid*, 2021, 107(9): 398-405.
- [3] ZHANG J, GUO Y, MA Y, et al. miR-433-3p targets AJUBA to inhibit malignant progression of glioma [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2022, 29(1): 44-54.
- [4] 陈虹, 崔婧, 罗晨, 等. miR-433-3p靶向HP1BP3抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力[J]. *中国病理生理杂志* (CHEN H, CUI J, LUO C, et al. miR-433-3p targets HP1BP3 to inhibit proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells [J]. *Chin J Pathophysiol*), 2023, 39(11): 1964-72.
- [5] LAVICTOIRE S J, JOMAA D, GONT A, et al. Identification of Rac guanine nucleotide exchange factors promoting Lg11 phosphorylation in glioblastoma [J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(5): 101172-88.
- [6] PAYAPILLY A, GUILBERT R, DESCAMPS T, et al. TIAM1-RAC1 promote small-cell lung cancer cell survival through antagonizing Nur77-induced BCL2 conformational change [J]. *Cell Rep*, 2021, 37(6): 109979.
- [7] HE J H, LI Y G, HAN Z P, et al. The CircRNA-ACAP2/Hsa-miR-21-5p/Tiam1 regulatory feedback circuit affects the proliferation, migration, and invasion of colon cancer SW480 cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2021, 55(3): 378-89.
- [8] 鲍小栋, 方杰, 金俊华, 等. 蛇床子素在体外对人肝癌细胞增殖和侵袭的抑制作用[J]. *温州医科大学学报* (BAO X D, FANG J, JIN J H, et al. The inhibiting effect of osthole on proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Wenzhou Med Univer*), 2022, 52(1): 28-34.
- [9] 吴梅梅, 李瀚旻, 任慧莹, 等. 蛇床子素植物半乳糖脂肝靶向脂质体对HepG-2细胞的影响研究[J]. *中西医结合肝病杂志* (WU M M, LI H M, REN H Y, et al. Influence of osthole-loaded plant galactolipid liver-targeted liposome on HepG-2 cells [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis*), 2022, 32(6): 530-4.
- [10] 杨士杰, 刘春盛, 高丽环. 蛇床子素对肝癌Huh7细胞增殖、凋亡及放射敏感性的影响及机制研究[J]. *中国药师* (YANG S J, LIU C S, GAO L H. Effects of osthole on proliferation, apoptosis and radiosensitivity of hepatocellular carcinoma Huh7 cells and underlying mechanism [J]. *China Pharm*), 2020, 23(11): 2094-9.
- [11] SORRENTINO L, COSIMELLI M, SAMPIETRO G M. Laparoscopy and survival in colon cancer: a further step beyond the non-inferiority [J]? *Dig Liver Dis*, 2021, 53(8): 935-6.
- [12] ALTVES S, GUCLU E, YETISGIN E, et al. Upregulation of Immune checkpoint PD-L1 in colon cancer cell lines and activation of T cells by leuconostoc mesenteroides [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2024, 40(7): 204-16.
- [13] 孙兴雅, 刘馨. 蛇床子素对人舌鳞癌Tca8113细胞凋亡和自噬的影响[J]. *中国医学科学院学报* (SUN X Y, LIU X. Effects of osthole on apoptosis and autophagy of human tongue cancer Tca8113 cells [J]. *Acta Acad Med Sine*), 2021, 43(4): 501-6.
- [14] 皇甫梦杰, 王娟, 于丹, 等. 蛇床子素对卵巢癌SKOV3细胞凋亡的影响[J]. *中华中医药杂志* (HUANGFU M J, WANG J, YU D, et al. Effects of osthole on apoptosis of ovarian cancer SKOV3 cells [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*), 2021, 36(1): 459-62.
- [15] 徐瑞, 张岩. 蛇床子素治疗乳腺癌潜在机制的生物信息学分析[J]. *中华肿瘤防治杂志* (XU R, ZHANG Y. *In silico* analysis of the potential mechanism of osthole on breast cancer MCF-7 cells [J]. *Chin J Cancer Prev Treat*), 2021, 28(13): 980-7.
- [16] LI T, LI S. Circ_0023984 facilitates esophageal squamous cell carcinoma progression by regulating miR-433-3p/REV3L axis [J]. *Dig Dis Sci*, 2022, 67(3): 892-903.
- [17] JIN M, ZHANG F, LI Q, et al. Circ_0011292 knockdown mitigates progression and drug resistance in PTX-resistant non-small-cell lung cancer cells by regulating miR-433-3p/CHEK1 axis [J]. *Thorac Cancer*, 2022, 13(9): 1276-88.
- [18] ZHANG M, YU G Y, LIU G, et al. Circular RNA circ_0002137 regulated the progression of osteosarcoma through regulating miR-433-3p/IGF1R axis [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(6): 1806-16.
- [19] HAN F J, LI J, SHEN Y, et al. microRNA-1271-5p/TIAM1 suppresses the progression of ovarian cancer through inactivating Notch signaling pathway [J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1): 110-9.
- [20] 吴玉伟, 向从明, 孙承文, 等. LNX1通过调控TIAM1/ERK信号通路抑制肾透明细胞癌细胞的增殖、侵袭和迁移[J]. *肿瘤* (WU Y W, XIANG C M, SUN C W, et al. LNX1 inhibits the proliferation, invasion and migration of renal clear cell carcinoma cells by regulating TIAM1/ERK signaling pathway [J]. *Tumor*), 2023, 43(1): 1-15.