

miR-338-3p通过GPX4/ACSL4/ACSL3通路 对结直肠癌细胞恶性进展的作用

阮晓燕¹ 杨丹^{1*} 任骏²

(¹武汉市第一医院麻醉科, 武汉 430010; ²武汉市第一医院胃肠外科, 武汉 430010)

摘要 该文旨在探究 miR-338-3p 通过调控谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)/长链酰基辅酶A合成酶4(ACSL4)/长链酰基辅酶A合成酶3(ACSL3)通路对结直肠癌(CRC)细胞恶性进展的作用。选择人CRC细胞LS513为研究对象, 将其随机分为: Control组、miR-NC组、miR-338-3p mimics组、miR-338-3p mimics+pcDNA-NC组、miR-338-3p mimics+pcDNA-GPX4组。qRT-PCR法检测细胞miR-338-3p、GPX4 mRNA表达情况; CCK8和克隆形成实验检测细胞的增殖情况; 划痕实验检测细胞的迁移情况; Transwell实验检测细胞的侵袭情况; Western blot检测细胞中GPX4、ACSL4、ACSL3、MMP-9、Bcl-2蛋白表达情况; 双荧光素酶实验检测miR-338-3p与GPX4的靶向关系。与Control组和miR-NC组相比, miR-338-3p mimics组细胞miR-338-3p表达水平、凋亡率以及ACSL4、ACSL3蛋白水平升高($P<0.05$), GPX4 mRNA表达水平、存活率、克隆数、迁移数、侵袭数以及GPX4、MMP-9、Bcl-2蛋白表达水平降低($P<0.05$); 与miR-338-3p mimics组、miR-338-3p mimics+pcDNA-NC组相比, miR-338-3p mimics+pcDNA-GPX4组细胞GPX4 mRNA表达水平、存活率、克隆数、迁移数、侵袭数以及GPX4、MMP-9、Bcl-2蛋白表达水平升高($P<0.05$), 凋亡率以及ACSL4、ACSL3蛋白水平降低($P<0.05$); 与miR-NC+GPX4-WT组相比, miR-338-3p mimics+GPX4-WT组细胞双荧光素酶活性明显降低($P<0.05$)。miR-338-3p可能通过调控GPX4/ACSL4/ACSL3通路, 进而抑制CRC细胞恶性进展。

关键词 结直肠癌; miR-338-3p; 谷胱甘肽过氧化物酶4; 长链酰基辅酶A合成酶4; 长链酰基辅酶A合成酶3; 恶性进展

The Effect of miR-338-3p on Malignant Progression of Colorectal Cancer Cells through GPX4/ASCL4/ACSL3 Pathway

RUAN Xiaoyan¹, YANG Dan^{1*}, REN Jun²

(¹Department of Anesthesiology, Wuhan First Hospital, Wuhan 430010, China;

²Department of Gastrointestinal Surgery, Wuhan First Hospital, Wuhan 430010, China)

Abstract This study aims to investigate the effect of miR-338-3p on the malignant progression of CRC (colorectal cancer) cells by adjusting GPX4 (glutathione peroxidase 4)/ACSL4 (long chain acyl CoA synthase 4)/ACSL3 (long chain acyl CoA synthase 3) pathway. Human LS513 CRC cells were selected as the study subjects and randomly assigned into Control group, miR-NC group, miR-338-3p mimics group, miR-338-3p mimics+pcDNA-NC group, and miR-338-3p mimics+pcDNA-GPX4 group. qRT-PCR was used to detect the expression of miR-338-3p and GPX4 mRNA in cells. CCK8 and clone formation experiments were used to detect cell proliferation. Scratch experiment was used to detect cell migration. Transwell experiment was used to detect cell invasion. Western blot was used to detect

收稿日期: 2025-05-08

接受日期: 2025-08-06

*通信作者。Tel: 027-85332222, E-mail: 519535571@qq.com

Received: May 8, 2025

Accepted: August 6, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-27-85332222, E-mail: 519535571@qq.com

the protein expression of GPX4, ACSL4, ACSL3, MMP-9, and Bcl-2 in cells. Dual luciferase assay was used to detect the targeting relationship between miR-338-3p and *GPX4*. For the Control group and miR-NC group, the miR-338-3p mimics group showed an increase in miR-338-3p, apoptosis rate, and ACSL4 and ACSL3 protein levels ($P<0.05$), and a decrease in *GPX4* mRNA, survival rate, clone number, migration number, invasion number, and GPX4, MMP-9, and Bcl-2 protein levels ($P<0.05$). For the miR-338-3p mimics group and the miR-338-3p mimics+pcDNA-NC group, the miR-338-3p mimics+pcDNA-GPX4 group showed an increase in *GPX4* mRNA, survival rate, clone number, migration number, invasion number, and GPX4, MMP-9, and Bcl-2 protein levels ($P<0.05$), and a decrease in apoptosis rate, and ACSL4 and ACSL3 protein levels ($P<0.05$). For the miR-NC+*GPX4*-WT group, the miR-338-3p mimics+*GPX4*-WT group showed a prominent decrease in dual luciferase activity ($P<0.05$). miR-338-3p may inhibit the malignant progression of CRC cells by adjusting GPX4/ACSL4/ACSL3 pathway.

Keywords colorectal cancer; miR-338-3p; glutathione peroxidase 4; long chain acyl CoA synthetase 4; long chain acyl CoA synthetase 3; malignant progression

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是一种常见的消化系统癌症,具有较高的发病率及死亡率,据统计,该疾病在我国死亡率排名第二,严重威胁患者的生命安全^[1]。研究发现,CRC早期病症较为隐匿,无法在最佳治疗时期得到有效治疗,导致多数患者治疗时出现转移等情况,增大治疗难度,影响预后情况^[2]。目前,临床多采用手术治疗、化疗及靶向治疗等综合治疗手段缓解病情发展,但是总体治疗效果无法达到预期^[3],因此,寻求新型有效的治疗靶点,对制定合理有效的治疗策略具有重要意义。微小RNA(microRNA, miRNA)主要通过调控靶基因表达来影响各种生理病理学过程,已有研究表明,多种miRNA在CRC的发生发展过程中发挥重要作用。研究发现,miR-338-3p可参与CRC的转移、侵袭等过程^[4-5]。谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)/长链酰基辅酶A合成酶4(long chain acyl CoA synthase 4, ACSL4)可调控细胞铁死亡,其中,GPX4可抑制脂质过氧化,进而避免细胞氧化受损;ACSL4可促进不饱和脂肪酸生成,促进细胞铁死亡^[6-7];长链酰基辅酶A合成酶3(long chain acyl CoA synthase 3, ACSL3)可调控饱和脂肪酸在磷脂中的比例,其高表达会促进细胞铁死亡^[8]。现有研究表明,铁死亡是癌症发生发展过程中重要的生理病理机制,而GPX4/ACSL4/ACSL3通路可通过抑制铁死亡参与癌症的发展过程,但是其在癌症中的作用仍待进一步探究^[9]。但是miR-338-3p是否通过调控GPX4/ACSL4/ACSL3通路影响CRC细胞恶性进展尚未明确。基于此,本研究通过探究miR-338-3p调控GPX4/ACSL4/ACSL3通路对CRC细胞恶性进展的影响,进一步寻求miR-338-3p的潜在的作用机制,进而为

开发新型靶向药物提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料

人正常结肠黏膜细胞FHC(货号:XY376)购自上海烜雅生物科技有限公司;人CRC细胞LS513、SW480、HCT116、HT-29(货号:PT-H2189、PT-H1504、PT-H1198、PT-H1282)购自上海匹拓生物科技有限公司;miR-338-3p mimics、miR-NC购自上海百力格生物技术有限公司;DMEM培养基(货号:QYK-10110)购自上海齐源生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(货号:KGA1102-100、KGP113)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;ECL化学发光试剂盒(货号:WLA006a)、Trizol试剂盒(货号:WLA088)购自沈阳万类生物科技有限公司;PrimeScript RT试剂盒购自武汉科昊佳生物科技有限公司;GPX4、ACSL4、ACSL3、MMP-9、Bcl-2抗体及羊抗兔二抗、GAPDH(货号:ab125066、ab155282、ab321811、ab283575、ab218123、ab6721、ab9485)购自英国Abcam公司;流式细胞仪(型号:Cytect™ NL-CLC)购自上海仁科生物科技有限公司;凝胶成像系统(型号:KETA M)购自美国Wealtec公司;倒置显微镜(型号:Lumascop™ 400)购自北京隆福佳生物科技有限公司;多功能酶标仪(型号:SpectraMax iD3)购自广州贝特生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 将LS513、SW480、HCT116、HT-29细胞培养(37℃、5% CO₂)在DMEM培养基(10%胎牛血清、1%青-链霉素)中。将细胞

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	上游引物(5'→3') Upstream primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Downstream primer (5'→3')
miR-338-3p	GAT GCG GCA GCT GCG ATC GAC	ATC CGA TCG CGA TCG ACG ATC
GPX4	AAT TCG CAG CCA AGG ACA TC	AGG CCA GGA TTC GTA AAC CA
U6	CTC GCT TGG GCA GCA CA	AAC GCT TCA CGA ATT TGG GT
GAPDH	CAA CTC CCT CAA GAT TGT CAG CAA	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA

随机分为Control组、miR-NC组、miR-338-3p mimics组、miR-338-3p mimics+pcDNA-NC组、miR-338-3p mimics+pcDNA-GPX4组,除Control组进行常规培养外,其余组分别转染对应质粒载体,并与Lipofectamine 3000转染试剂混合孵育,培养(37℃、5%CO₂)6h后更换含有血清培养基继续培养48h。

1.2.2 qRT-PCR法检测细胞miR-338-3p、GPX4 mRNA表达水平 提取不同细胞系细胞以及不同组别LS513细胞总RNA(Trizol试剂盒),逆转录合成cDNA(PrimeScript RT试剂盒),使用qRT-PCR系统检测目标基因转录本,miR-338-3p、GPX4分别以U6、GAPDH为内参。反应条件:95℃预变性5min;95℃变性10s,60℃退火60s,60℃延伸60s,40个循环;采用2^{-ΔΔCt}法计算基因相对表达量。引物序列见表1。

1.2.3 CCK8和克隆形成实验检测LS513细胞的增殖情况 CCK8:将细胞接种(5×10⁴/孔)在96孔板上,加入10μL CCK8试剂后,37℃孵育2h,酶标仪检测吸光度(D₄₅₀)值,计算细胞存活率,细胞存活率=[(D_{实验组}-D_{空白组})/(D_{对照组}-D_{空白组})]×100%。

克隆形成实验:将细胞以1×10⁵/孔接种在6孔板上培养(37℃、5%CO₂),通过观察发现克隆形成,PBS浸洗1min,4%多聚甲醛室温固定20min,0.5%结晶紫室温染色20min,观察并拍照,统计克隆细胞数。

1.2.4 划痕实验 在6孔板中接种(5×10⁵/孔)细胞并培养(37℃),形成融合的单层,用10μL微量移液器枪头刮擦细胞单层,形成划痕,PBS轻轻浸洗,添加适量培养液,继续培养24h,0、24h分别对创面进行拍照,计算细划痕愈合率。

1.2.5 Transwell实验检测LS513细胞的侵袭情况 各组细胞接种(1×10⁵/孔)在含有基质胶的Transwell小室的上室,随后下室加入500μL的DMEM培养基(含10%胎牛血清)培育(37℃)24h,4%多聚甲醛室温固定20min,0.1%结晶紫室温染色15min,于显微镜下统计侵袭数。

1.2.6 流式细胞仪检测LS513细胞的凋亡情况 收集各组细胞,将细胞接种(2×10⁵/孔)在6孔板中,24h后使用PBS洗涤,并加入5μL Annexin V-FITC和PI染液于室温下进行避光染色,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.7 Western blot检测蛋白表达情况 取细胞总蛋白并定量,电泳分离蛋白,转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温下封闭1h,4℃下与一抗GPX4(1:1000)、ACSL4(1:1000)、ACSL3(1:1000)、MMP-9(1:1000)、Bcl-2(1:1000)孵育过夜。室温下二抗(1:2000)孵育1h,使用ECL系统检测信号,凝胶成像系统曝光、拍照,以GAPDH(1:2500)为标准计算蛋白相对表达水平。

1.2.8 miR-338-3p与GPX4的靶向关系验证 分别构建野生型GPX4质粒和突变型GPX4质粒并克隆到报告载体(命名为GPX4-WT和GPX4-MUT),随后将其分别与miR-NC、miR-338-3p mimic共转染到细胞中,孵育(37℃、5%CO₂)48h后,检测荧光素酶活性。

1.2.9 统计学分析 使用SPSS 25.0软件分析数据,计量数据以($\bar{x}\pm s$)描述,多组比较采用单因素方差分析,组间比较用SNK-*q*检验。*P*<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同细胞系中miR-338-3p、GPX4 mRNA表达比较

与FHC细胞相比,LS513、SW480、HCT116、HT-29细胞中miR-338-3p表达水平显著降低,GPX4 mRNA表达水平显著升高(*P*<0.05);相较于SW480、HCT116、HT-29细胞,LS513细胞miR-338-3p、GPX4 mRNA表达变幅更大,因此,后续实验选用LS513细胞进行(图1)。

2.2 过表达miR-338-3p对LS513细胞中miR-338-3p、GPX4 mRNA表达影响

与Control组和miR-NC组相比,miR-338-3p mim-

ics组细胞 miR-338-3p 表达水平升高 ($P<0.05$), *GPX4* mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$); 与 miR-338-3p mimics 组、miR-338-3p mimics+pcDNA-NC 组相比, miR-338-3p mimics+pcDNA-GPX4 组细胞 *GPX4* mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$)。见图2。

2.3 过表达 miR-338-3p 对 LS513 细胞增殖的影响

与 Control 组和 miR-NC 组相比, miR-338-3p mimics 组细胞存活率、克隆数降低 ($P<0.05$); 与 miR-338-3p mimics 组、miR-338-3p mimics+pcDNA-NC 组相比, miR-338-3p mimics+pcDNA-GPX4 组细胞存活率、克隆数升高 ($P<0.05$)。见图3和图4。

2.4 过表达 miR-338-3p 对 LS513 细胞迁移的影响

与 Control 组和 miR-NC 组相比, miR-338-3p mimics 组细胞划痕愈合率降低 ($P<0.05$); 与 miR-338-3p mimics 组、miR-338-3p mimics+pcDNA-NC 组相比, miR-338-3p mimics+pcDNA-GPX4 组细胞划痕愈合率升高 ($P<0.05$)。见图5和图6。

2.5 过表达 miR-338-3p 对 LS513 细胞侵袭的影响

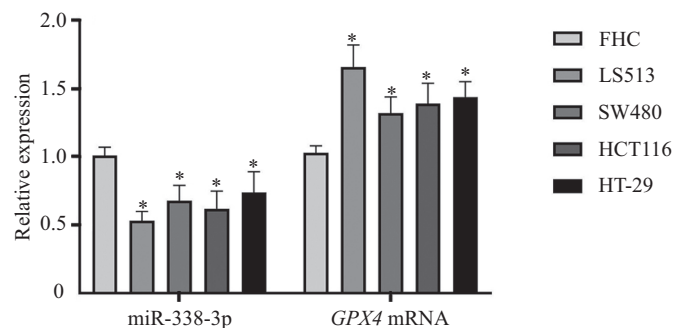
与 Control 组和 miR-NC 组相比, miR-338-3p mimics 组细胞侵袭数降低 ($P<0.05$); 与 miR-338-3p mimics 组、miR-338-3p mimics+pcDNA-NC 组相比, miR-338-3p mimics+pcDNA-GPX4 组细胞侵袭数升高 ($P<0.05$)。见图7和图8。

2.6 过表达 miR-338-3p 对 LS513 细胞凋亡的影响

与 Control 组和 miR-NC 组相比, miR-338-3p mimics 组细胞凋亡率升高 ($P<0.05$); 与 miR-338-3p mimics 组、miR-338-3p mimics+pcDNA-NC 组相比, miR-338-3p mimics+pcDNA-GPX4 组细胞凋亡率降低 ($P<0.05$)。见图9和图10。

2.7 过表达 miR-338-3p 对 LS513 细胞 GPX4、ACSL4、ACSL3、MMP-9、Bcl-2 蛋白表达的影响

与 Control 组和 miR-NC 组相比, miR-338-3p mimics 组 GPX4、MMP-9、Bcl-2 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$), ACSL4、ACSL3 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$); 与 miR-

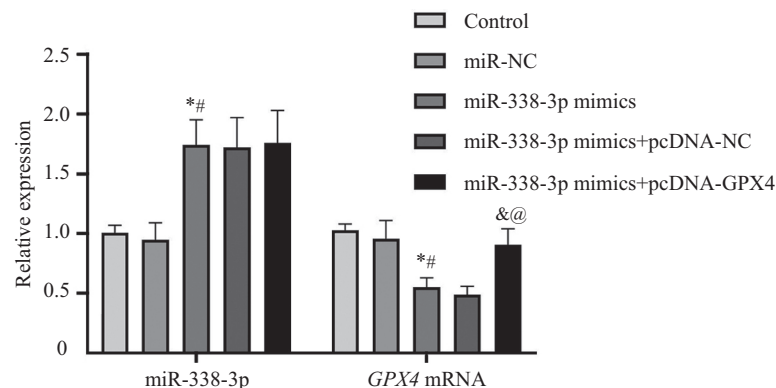


* $P<0.05$, 与 FHC 细胞比较。 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

* $P<0.05$ compared with FHC cells. $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

图1 不同细胞系中 miR-338-3p、GPX4 mRNA 表达比较

Fig.1 Comparison of miR-338-3p and GPX4 mRNA expression in different cell lines



* $P<0.05$, 与 Control 组比较; # $P<0.05$, 与 miR-NC 组比较; * $P<0.05$, 与 miR-338-3p mimics 组比较; @ $P<0.05$, 与 miR-338-3p mimics+pcDNA-NC 组比较。 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

* $P<0.05$ compared with Control group; # $P<0.05$ compared with miR-NC group; * $P<0.05$ compared with miR-338-3p mimics group; @ $P<0.05$ compared with miR-338-3p mimics+pcDNA-NC group. $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

图2 过表达 miR-338-3p 对 LS513 细胞中 miR-338-3p、GPX4 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effects of overexpression of miR-338-3p on the expression of miR-338-3p and GPX4 mRNA in LS513 cells

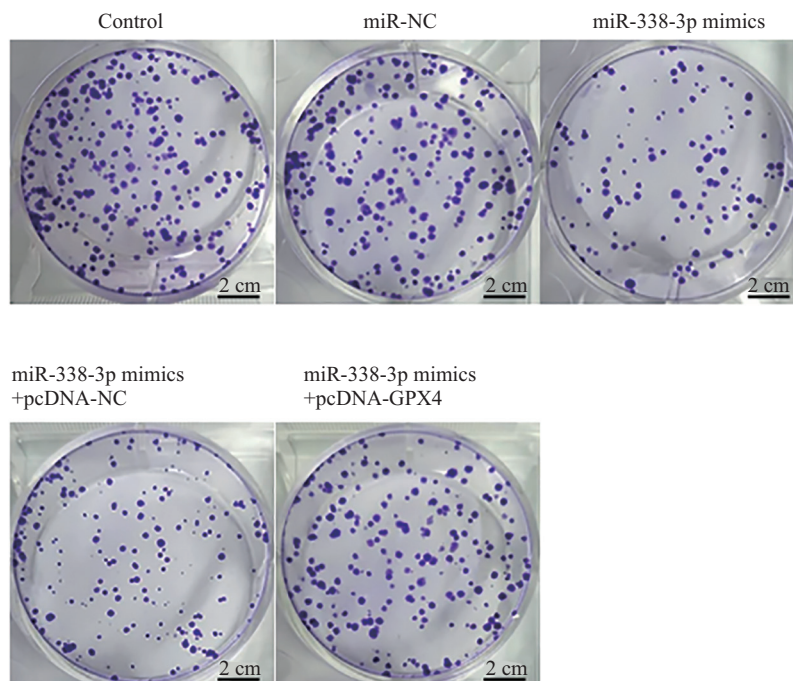
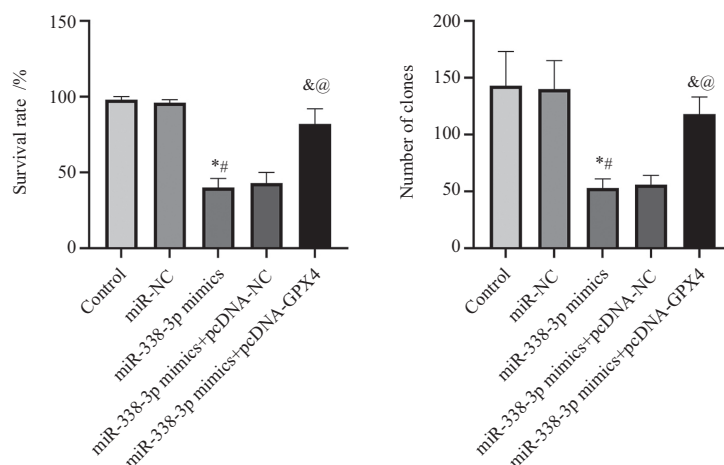


图3 克隆形成实验检测LS513细胞的增殖

Fig.3 Clone formation experiment detects the proliferation of LS513 cells



* $P < 0.05$, 与Control组比较; # $P < 0.05$, 与miR-NC组比较; & $P < 0.05$, 与miR-338-3p mimics组比较; @ $P < 0.05$, 与miR-338-3p mimics+pcDNA-NC组比较。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with miR-NC group; & $P < 0.05$ compared with miR-338-3p mimics group; @ $P < 0.05$ compared with miR-338-3p mimics+pcDNA-NC group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

图4 过表达miR-338-3p对LS513细胞增殖的影响

Fig.4 Effects of overexpression of miR-338-3p on LS513 cell proliferation

338-3p mimics组、miR-338-3p mimics+pcDNA-NC组相比, miR-338-3p mimics+pcDNA-GPX4组 GPX4、MMP-9、Bcl-2蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), ACSL4、ACSL3蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。见图11和图12。

2.8 miR-338-3p和GPX4的靶向关系

miR-338-3p和GPX4存在结合位点(图13)。与miR-NC+GPX4-WT组相比, miR-338-3p mimics+GPX4-WT组

细胞双荧光素酶活性明显降低 ($P < 0.05$)。见图14。

3 讨论

据报道, CRC发病率呈上升趋势, 在世界范围内不断升高, CRC占据所有癌症病例的10%, 成为世界一大卫生问题^[10]。目前, 临床可采用手术、化学药物治疗、免疫治疗以及靶向治疗等多种治疗方式对

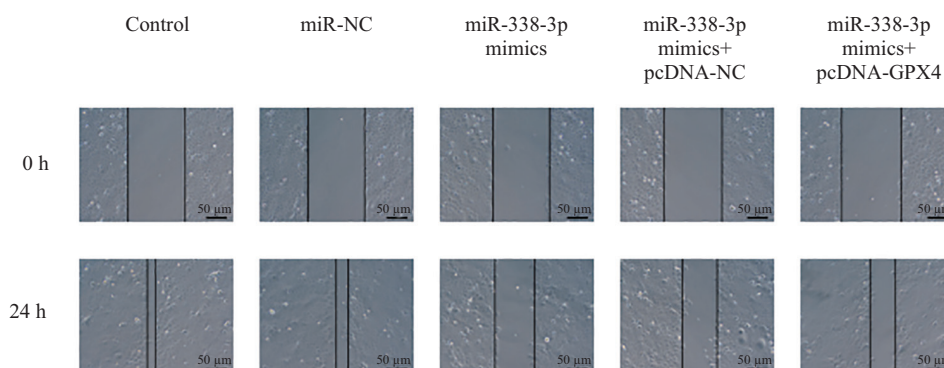
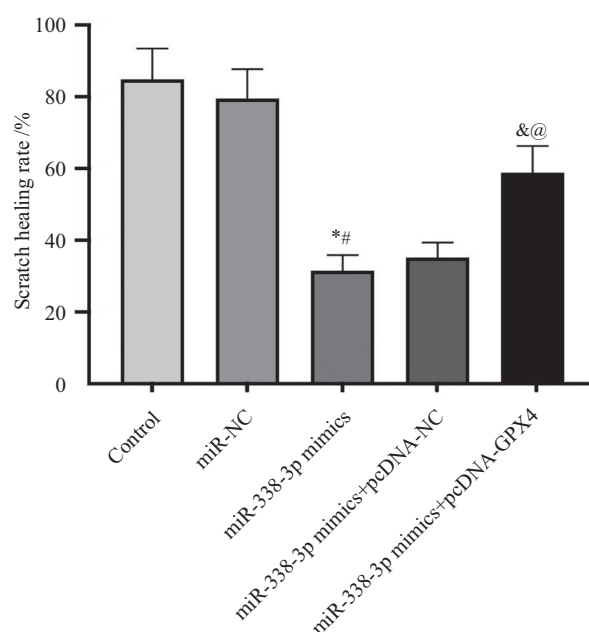


图5 划痕实验检测LS513细胞的迁移情况

Fig.5 Scratch experiment detects the migration of LS513 cells



* $P < 0.05$, 与Control组比较; # $P < 0.05$, 与miR-NC组比较; * $P < 0.05$, 与miR-338-3p mimics组比较; @ $P < 0.05$, 与miR-338-3p mimics+pcDNA-NC组比较。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with miR-NC group; * $P < 0.05$ compared with miR-338-3p mimics group; @ $P < 0.05$ compared with miR-338-3p mimics+pcDNA-NC group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

图6 过表达miR-338-3p对LS513细胞迁移的影响

Fig.6 Effects of overexpression of miR-338-3p on LS513 cell migration

CRC患者进行治疗,但是患者存在一定复发率,导致其预后情况较差,无法达到预期的疗效^[11]。近年来,随着医疗技术的不断发展,治疗策略不断更新,个体化分子靶向治疗作为一种新型治疗策略^[12],受到广泛关注和研究,通过对CRC的发病机制深入探究,开发新型治疗药物,对改善患者疗效及预后具有重要意义。因此,寻找新的靶向治疗药物、发展个体化治疗策略是目前临床亟需解决的问题。

近期研究表明,miRNA可参与调控癌症的发生发展,与癌细胞恶性生物学行为密切相关^[13]。miR-338-

3p被证实多种癌症中发挥重要的作用^[14]。NI等^[15]发现,miR-338-3p在CRC患者中表达下调,TDGFIP3可阻止miR-338-3p与PKM2相结合,进而促进CRC细胞增殖。LIN等^[16]发现,在CRC组织和细胞中,miR-338-3p表达均下调,通过沉默circ_0004585,可促进miR-338-3p表达水平升高,进而阻碍癌细胞的恶性进展。MENG等^[17]表明,miR-338-3p可能通过调控UBE2Q1表达,进而抑制癌细胞恶性进展。本研究结果显示,过表达miR-338-3p可引起LS513细胞存活率、克隆数、迁移数、侵袭数及其相关蛋白MMP-9、Bcl-2表达水平降低,调

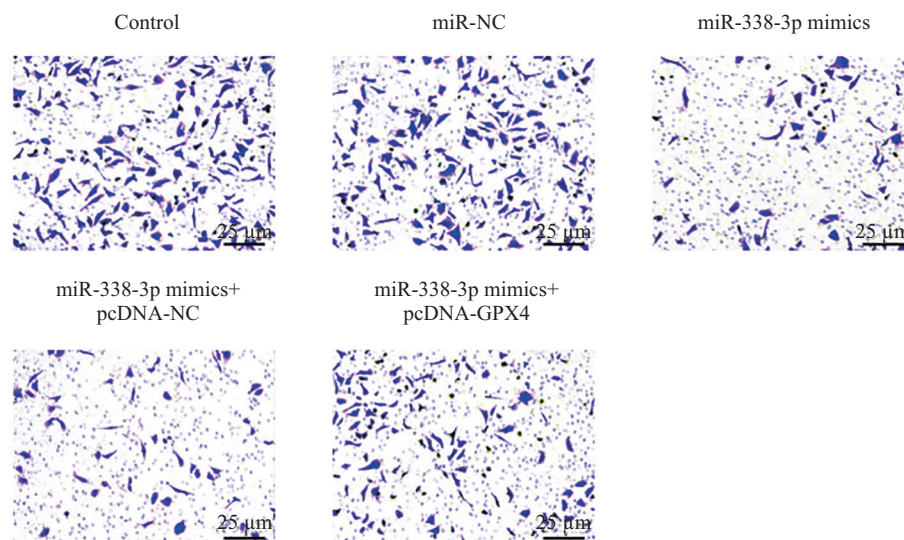
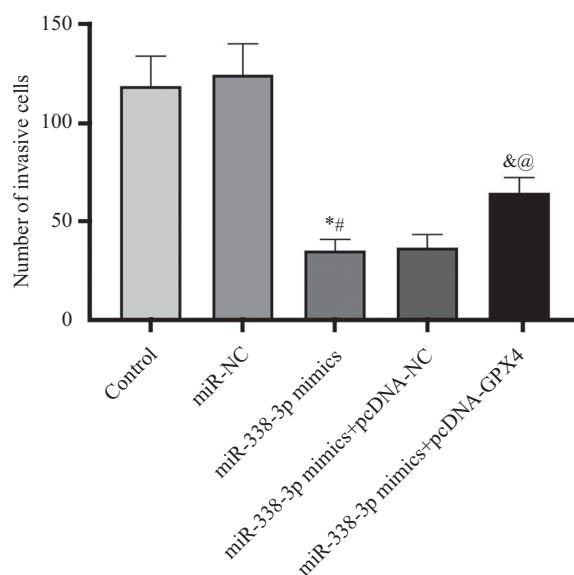


图7 Transwell实验检测LS513细胞的侵袭情况

Fig.7 Transwell experiment detects invasion of LS513 cells



* $P < 0.05$, 与Control组比较; # $P < 0.05$, 与miR-NC组比较; & $P < 0.05$, 与miR-338-3p mimics组比较; @ $P < 0.05$, 与miR-338-3p mimics+pcDNA-NC组比较。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with miR-NC group; & $P < 0.05$ compared with miR-338-3p mimics group; @ $P < 0.05$ compared with miR-338-3p mimics+pcDNA-NC group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

图8 过表达miR-338-3p对LS513细胞侵袭的影响

Fig.8 Effects of overexpression of miR-338-3p on LS513 cell invasion

亡率升高,提示过表达miR-338-3p可通过抑制癌细胞增殖、迁移、侵袭,促进癌细胞凋亡,起到抑制癌症发展的作用。

GPX4是一种铁死亡的抑制因子,可通过还原磷脂过氧化物,进而阻止脂质过氧化物反应,研究表明,下调GPX4可促进铁死亡的发生^[18]。相关研究表明,ACSL4是铁死亡的一种促进因子,可促进不饱和脂肪酸与辅酶A相结合,进而促进铁死亡^[19]。ACSL3

可通过调控细胞膜中的油酸平衡,进而起到调控细胞铁死亡的作用,并且与ACSL4存在相互作用^[20]。DONG等^[21]发现,下调GPX4/ACSL4通路可促进细胞发生铁死亡,进而抑制癌细胞的增殖、迁移,GPX4可作为肺癌治疗的潜在靶点。本研究中,过表达miR-338-3p后,GPX4蛋白表达水平降低,ACSL4、ACSL3蛋白表达水平升高,经靶点预测可知,miR-338-3p与GPX4存在结合位点,miR-338-3p可靶向抑制GPX4表

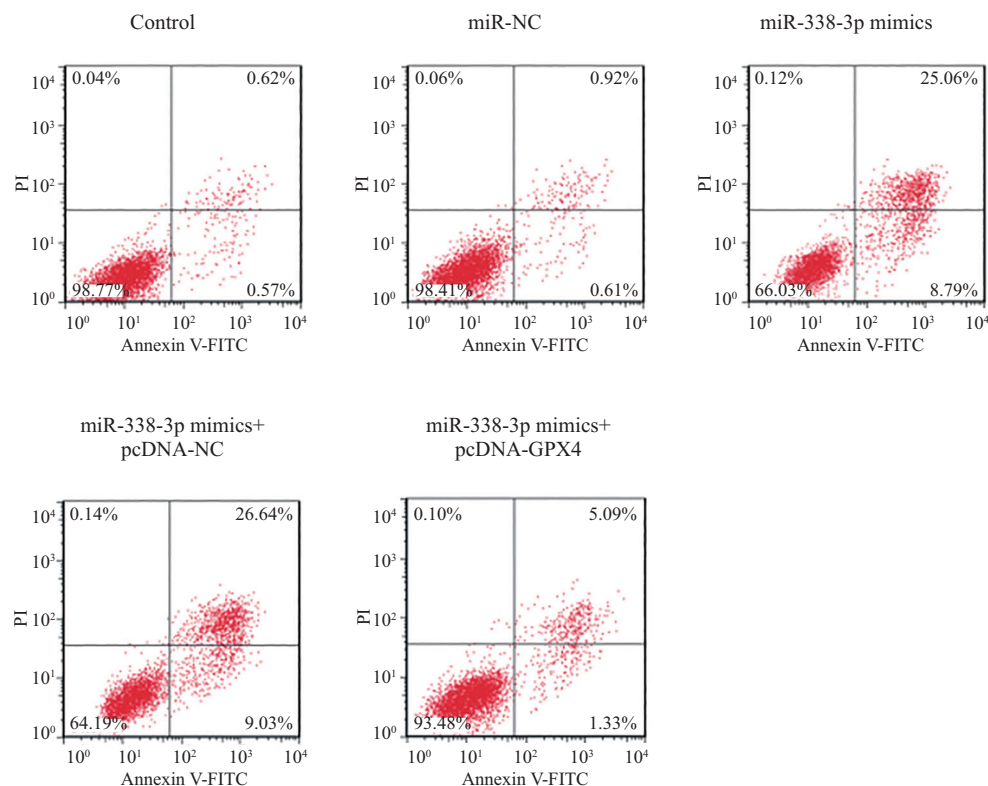
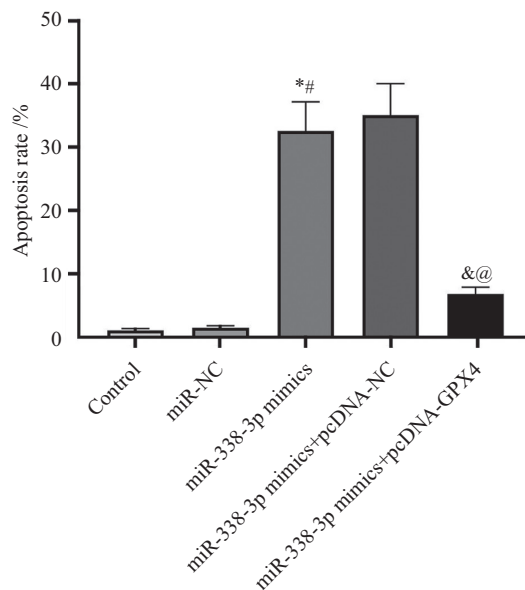


图9 流式细胞仪检测LS513细胞凋亡情况

Fig.9 Flow cytometry detection of apoptosis in LS513 cells



* $P < 0.05$, 与Control组比较; # $P < 0.05$, 与miR-NC组比较; * $P < 0.05$, 与miR-338-3p mimics组比较; @ $P < 0.05$, 与miR-338-3p mimics+pcDNA-NC组比较。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with miR-NC group; * $P < 0.05$ compared with miR-338-3p mimics group; @ $P < 0.05$ compared with miR-338-3p mimics+pcDNA-NC group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

图10 过表达miR-338-3p对LS513细胞凋亡率的影响

Fig.10 Effect of overexpression of miR-338-3p on apoptosis rate of LS513 cells

达, 过表达 *GPX4* 可部分逆转过表达 miR-338-3p 对细胞恶性行为的影响, 提示过表达 miR-338-3p 抑制癌细胞增殖、迁移、侵袭, 促进癌细胞凋亡, 可能是通过

调控 *GPX4*/*ACSL4*/*ACSL3* 通路实现的。

综上所述, miR-338-3p 可能通过调控 *GPX4*/*ACSL4*/*ACSL3* 通路, 进而抑制 CRC 细胞恶性进展, 可为临床治

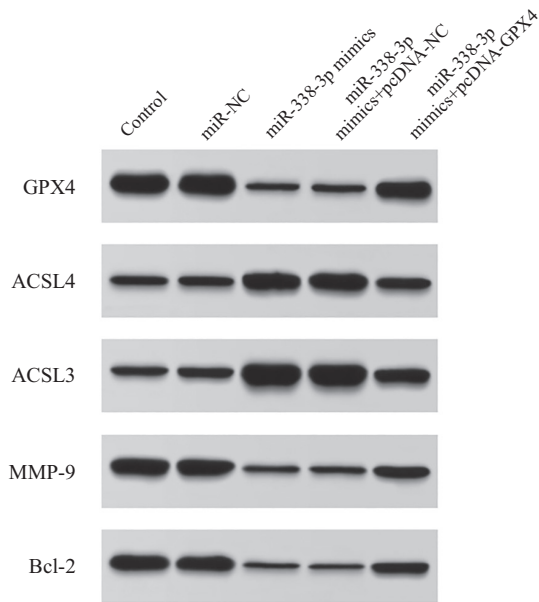
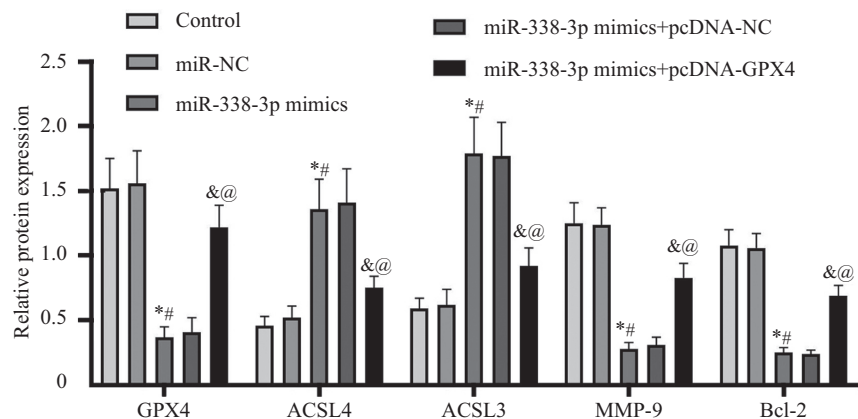


图11 Western blot检测LS513细胞中GPX4、ACSL4、ACSL3、MMP-9、Bcl-2蛋白表达情况
Fig.11 Western blot detection of GPX4, ACSL4, ACSL3, MMP-9, Bcl-2 protein expression in LS513 cells



* $P<0.05$, 与Control组比较; # $P<0.05$, 与miR-NC组比较; * $P<0.05$, 与miR-338-3p mimics组比较; @ $P<0.05$, 与miR-338-3p mimics+pcDNA-NC组比较。 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。
* $P<0.05$ compared with Control group; # $P<0.05$ compared with miR-NC group; * $P<0.05$ compared with miR-338-3p mimics group; @ $P<0.05$ compared with miR-338-3p mimics+pcDNA-NC group. $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

图12 过表达miR-338-3p对LS513细胞GPX4、ACSL4、ACSL3、MMP-9、Bcl-2蛋白表达的影响
Fig.12 Effects of overexpression of miR-338-3p on GPX4, ACSL4, ACSL3, MMP-9, and Bcl-2 protein expression in LS513 cells

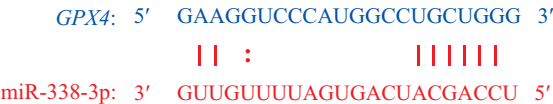
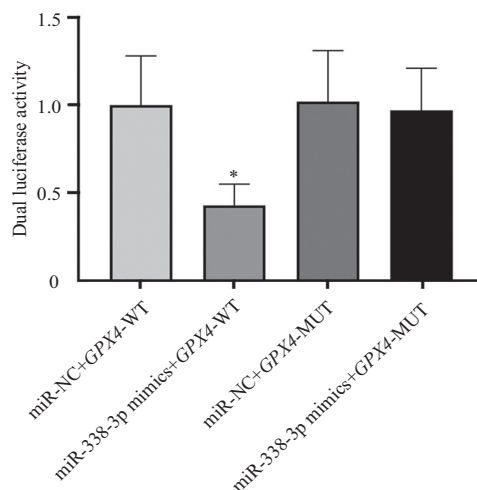


图13 miR-338-3p与GPX4的结合位点
Fig.13 The binding site of miR-338-3p to GPX4

疗提供新型靶点,有助于研发有效的靶向药物。但本研究尚存在一些局限性,仅用细胞实验分析CRC的作用机制,缺乏体内实验的研究,并且缺乏对铁死亡病理机制的进一步分析;此外,CRC的发生发展过程较为复杂,可能受其他作用机制调控,后续仍需进一步探究。

参考文献 (References)

[1] 郑荣寿,陈茹,韩冰峰,等. 2022年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志(ZHENG R S, CHEN R, HAN B F, et al. Analysis of the prevalence of malignant tumours in China in 2022 [J]. Chinese Journal of Oncology), 2024, 46(3): 221-31.
[2] CHENG T, PENG R, QU A, et al. High-dose rate endorectal



* $P < 0.05$, 与miR-NC+GPX4-WT组比较。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

* $P < 0.05$ compared with miR-NC+GPX4-WT group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$.

图14 双荧光素酶活性比较

Fig.14 Comparison of dual luciferase activity

- brachytherapy for rectal cancer: a state-of-the-art review [J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(11): 4145-56.
- [3] CHEN H, ZHANG J H, HAO Q, et al. Analysis of tumor micro-environment alterations in partially responsive rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2024, 39(1): 99-112.
- [4] XIONG J, ZHANG L, TANG R, et al. MicroRNA-301b-3p facilitates cell proliferation and migration in colorectal cancer by targeting HOXB1 [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 5839-49.
- [5] ZHANG W, WANG B, WANG Q, et al. Lnc-HSD17B11-1:1 functions as a competing endogenous RNA to promote colorectal cancer progression by sponging miR-338-3p to upregulate MACC1 [J]. *Front Genet*, 2020, 11(17): 628-39.
- [6] LIU Y, WAN Y, JIANG Y, et al. GPX4: the hub of lipid oxidation, ferroptosis, disease and treatment [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878(3): 1888-903.
- [7] DING K, LIU C, LI L, et al. Acyl-CoA synthase ACSL4: an essential target in ferroptosis and fatty acid metabolism [J]. *Chin Med J*, 2023, 136(21): 2521-37.
- [8] KLASSON T D, LAGORY E L, ZHAO H, et al. ACSL3 regulates lipid droplet biogenesis and ferroptosis sensitivity in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cancer Metab*, 2022, 10(1): 14-26.
- [9] LI M, MENG Z, YU S, et al. Baicalein ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis via regulating GPX4/ACSL4/ACSL3 axis [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 366(32): 1137-48.
- [10] CERVANTES A, ADAM R, ROSELLÓ S, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2023, 34(1): 10-32.
- [11] 夏琪, 陈佳, 何钰洁, 等. 蟾毒灵通过JAK2/STAT3信号通路抑制结肠癌细胞的作用[J]. *中国临床药理学杂志* (XIA Q, CHEN J, HE Y J, et al. Bufalin inhibits the action of colorectal cancer cells through the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Chin J Clin Pharmacol*), 2024, 40(13): 1883-7.
- [12] LIU X, LIU Y, LIU Z, et al. CircMYH9 drives colorectal cancer growth by regulating serine metabolism and redox homeostasis in a p53-dependent manner [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 114-28.
- [13] ZHANG H R, WU S Y, FU Z X. LncRNA-cCSC1 promotes cell proliferation of colorectal cancer through sponging miR-124-3p and upregulating CD44 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 557(15): 228-35.
- [14] HONG Y, CHEN X, LIANG Z, et al. MiR-338-3p inhibits cell migration and invasion in human hypopharyngeal cancer via downregulation of ADAM17 [J]. *Anticancer Drugs*, 2020, 31(9): 925-31.
- [15] NI Q, AN M, LUO S, et al. Pseudogene TDGF1P3 regulates the proliferation and metastasis of colorectal cancer cells via the miR-338-3p-PKM2 axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 638(15): 7-13.
- [16] LIN Z, LIN J. Circ_0004585 facilitates tumorigenesis of colorectal cancer via modulating the miR-338-3p/ZFX axis and activating the MEK/ERK pathway [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2023, 16(2): 159-71.
- [17] MENG F, LUO X, LI C, et al. LncRNA LINC00525 activates HIF-1 α through miR-338-3p/UBE2Q1/ β -catenin axis to regulate the Warburg effect in colorectal cancer [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 2554-67.
- [18] DAR N J, JOHN U, BANO N, et al. Oxytosis/ferroptosis in neurodegeneration: the underlying role of master regulator glutathione peroxidase 4 (GPX4) [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(3): 1507-26.
- [19] BOUCHAOUI H, MAHONEY-SANCHEZ L, GARÇON G, et al. ACSL4 and the lipoxygenases 15/15B are pivotal for ferroptosis induced by iron and PUFA dyshomeostasis in dopaminergic neurons[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 195(19): 145-57.
- [20] YANG Y, ZHU T, WANG X, et al. ACSL3 and ACSL4, distinct roles in ferroptosis and cancers [J]. *Cancers*, 2022, 14(23): 5896-905.
- [21] DONG J, QI F, QIE H, et al. Oleic acid inhibits SDC4 and promotes ferroptosis in lung cancer through GPX4/ACSL4 [J]. *Clin Respir J*, 2024, 18(10): 70014-25.