

miR-411-3p调控HIF-1 α /VEGF通路对结直肠癌 细胞增殖、迁移和血管生成拟态的影响

刘宇关¹ 刘林涛² 徐博² 王茂楠^{2*}

(¹吉林省人民医院急诊外科, 长春 130000; ²吉林省人民医院结直肠肛门外科, 长春 130000)

摘要 该文旨在探究miR-411-3p调控缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)/血管内皮生长因子(VEGF)通路对结直肠癌(CRC)细胞增殖、迁移和血管生成拟态的影响。将体外培养人CRC细胞SW480随机分为Control组、miR-NC组、miR-411-3p mimics组、DMOG组(HIF-1 α /VEGF通路激活剂 DMOG)、miR-411-3p mimics+DMOG组、miR-411-3p mimics+NC组和miR-411-3p mimics+HIF-1 α 组。采用双荧光素酶报告实验检测miR-411-3p与HIF-1 α 之间的关系; MTT、克隆形成实验检测各组细胞增殖情况; 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况; 划痕实验检测各组细胞迁移情况; 血管模拟形成实验检测各组细胞血管生成拟态(VM)形成情况; 免疫荧光实验检测各组细胞Ki67、CD31、VE-cadherin表达情况; qRT-PCR检测各组细胞miR-411-3p、HIF-1 α 、VEGF mRNA表达情况; Western blot实验检测各组细胞HIF-1 α 、凋亡、迁移相关蛋白表达情况。双荧光素酶报告实验结果显示, miR-411-3p mimics组与miR-NC组比较, 荧光素酶活性显著降低($P<0.05$)。miR-411-3p mimics组与Control组、miR-NC组比较, 细胞管腔结构破坏严重, 存活率、克隆形成数、划痕愈合率、管腔结构数量降低, Ki67、CD31、VE-cadherin荧光强度降低, HIF-1 α 、VEGF mRNA和蛋白表达水平以及N-cadherin表达水平降低, 凋亡率以及Bax、cleaved caspase-3、miR-411-3p、E-cadherin表达水平升高($P<0.05$); DMOG组与Control组比较, 细胞管腔结构损伤减轻, 克隆形成数、划痕愈合率、管腔结构数量升高, Ki67、CD31、VE-cadherin荧光强度升高, HIF-1 α 、VEGF mRNA和蛋白水平以及N-cadherin表达水平增加, 凋亡率以及Bax、cleaved caspase-3、E-cadherin表达水平降低($P<0.05$); miR-411-3p mimics+DMOG组与DMOG组比较, 细胞管腔结构破坏加重, 存活率、克隆形成数、划痕愈合率、管腔结构数量降低, Ki67、CD31、VE-cadherin荧光强度降低, HIF-1 α 、VEGF mRNA和蛋白水平以及N-cadherin表达水平降低, 凋亡率以及Bax、cleaved caspase-3、miR-411-3p、E-cadherin表达水平升高($P<0.05$); miR-411-3p mimics+DMOG组与miR-411-3p mimics组比较, 细胞管腔结构破坏减轻, 存活率、克隆形成数、划痕愈合率、管腔结构数量升高, Ki67、CD31、VE-cadherin荧光强度升高, HIF-1 α 、VEGF mRNA和蛋白水平以及N-cadherin表达水平增加, 凋亡率以及Bax、cleaved caspase-3、E-cadherin表达水平降低($P<0.05$); 与miR-411-3p mimics组、miR-411-3p mimics+NC组比较, miR-411-3p mimics+HIF-1 α 组细胞存活率、克隆形成数、划痕愈合率、管腔结构数量升高, Ki67、CD31、VE-cadherin荧光强度升高, HIF-1 α 、VEGF mRNA和蛋白水平以及N-cadherin表达水平升高, 凋亡率以及Bax、cleaved caspase-3、E-cadherin表达水平降低($P<0.05$)。上调miR-411-3p表达, 可能通过抑制HIF-1 α /VEGF通路, 抑制结直肠癌细胞增殖、迁移和VM形成。

关键词 miR-411-3p; 缺氧诱导因子1 α /血管内皮生长因子; 结直肠癌; 增殖; 迁移; 血管生成拟态

收稿日期: 2025-10-21

接受日期: 2025-12-08

吉林省卫生健康科技能力提升项目(批准号: 2023LL053)资助的课题

*通信作者。Tel: 0431-85595321, E-mail: hhaj51@163.com

Received: October 21, 2025

Accepted: December 8, 2025

This work was supported by the Jilin Province Health Science and Technology Capacity Improvement Project (Grant No.2023LL053)

*Corresponding author. Tel: +86-431-85595321, E-mail: hhaj51@163.com

The Effects of miR-411-3p on the Proliferation, Migration and Angiogenic Mimicry of Colorectal Cancer Cells by Regulating the HIF-1 α /VEGF Pathway

LIU Yuguan¹, LIU Lintao², XU Bo², WANG Maonan^{2*}

⁽¹⁾Emergency Surgery Department of Jilin Provincial People's Hospital, Changchun 130000, China;

⁽²⁾Colorectal and Anal Surgery of Jilin Provincial People's Hospital, Changchun 130000, China)

Abstract This study aims to discuss the effects of miR-411-3p on the proliferation, migration and angiogenesis mimicry of CRC (colorectal cancer) cells by regulating the HIF-1 α (hypoxia inducible factor 1 α)/VEGF (vascular endothelial growth factor) pathway. Human CRC cells SW480 cultured *in vitro* were randomly separated into the Control group, miR-NC group, miR-411-3p mimics group, DMOG group (HIF-1 α /VEGF pathway activator DMOG), miR-411-3p mimics+DMOG group, miR-411-3p mimics+NC group and miR-411-3p mimics+HIF-1 α group. The dual-luciferase reporter assay was used to detect the relationship between miR-411-3p and *HIF-1 α* . MTT and colony formation assay were used to detect cell proliferation. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The scratch test was used to detect the migration of cells in each group. Vascular simulation formation experiments were used to detect the formation of VM (vasculogenic mimicry) of cells. Immunofluorescence experiments were used to detect the expression levels of Ki67, CD31 and VE-cadherin in cells of each group. Moreover, qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of miR-411-3p, *HIF-1 α* , and *VEGF* in each group. Western blot was used to detect the expression of HIF-1 α , apoptosis and migration-related proteins in each group. The results of dual-luciferase reporter assay showed that the luciferase activity in the miR-411-3p mimics group was significantly lower than that in the miR-NC group ($P<0.05$). Compared with the Control group and the miR-NC group, the miR-411-3p mimics group had serious damage to the cell lumen structure, reduced survival rate, colony formation number, scratch healing rate, the number of luminal structures, and decreased fluorescence intensity of Ki67, CD31, and VE-cadherin. The expression levels of HIF-1 α , VEGF mRNA and protein, and N-cadherin were decreased, while the apoptosis rate and the expression levels of Bax, cleaved caspase-3, miR-411-3p and E-cadherin were increased ($P<0.05$). Compared with the Control group, the DMOG group had significantly improved cell lumen structure formation, increased colony formation number, scratch healing rate, the number of lumen structures, and increased fluorescence intensity of Ki67, CD31, and VE-cadherin. The mRNA and protein levels of HIF-1 α and VEGF, and the expression of N-cadherin were increased, while the apoptosis rate and the expression levels of Bax, cleaved caspase-3, and E-cadherin were decreased ($P<0.05$). Compared with the DMOG group, the miR-411-3p mimics+DMOG group had aggravated damage to the cell lumen structure, reduced survival rate, colony formation number, scratch healing rate, the number of luminal structures, and decreased fluorescence intensity of Ki67, CD31 and VE-cadherin. The mRNA and protein levels of HIF-1 α and VEGF, and the expression of N-cadherin were decreased, while the apoptosis rate and the expression levels of Bax, cleaved caspase-3, miR-411-3p, and E-cadherin were increased ($P<0.05$). Compared with the miR-411-3p mimics group, the miR-411-3p mimics+DMOG group had reduced damage to the luminal structure, increased survival rate, colony formation number, scratch healing rate, the number of luminal structures, and increased fluorescence intensity of Ki67, CD31 and VE-cadherin. The mRNA and protein levels of HIF-1 α and VEGF, and the expression of N-cadherin were increased, while the apoptosis rate and the expression levels of Bax, cleaved caspase-3, and E-cadherin were decreased ($P<0.05$). Compared with miR-411-3p mimics group and miR-411-3p mimics+NC group, the cell survival rate, colony formation number, scratch healing rate and the number of luminal structures in miR-411-3p mimics+HIF-1 α group were increased. The fluorescence intensity of Ki67, CD31 and VE-cadherin increased, while the mRNA and protein levels of HIF-1 α and VEGF and the expression level of N-cadherin increased. The apoptosis rate and the expression levels of Bax, cleaved caspase-3 and E-cadherin were significantly decreased ($P<0.05$). Up-regulating the

expression of miR-411-3p may inhibit the proliferation, migration and VM formation of colorectal cancer cells by suppressing the HIF-1 α /VEGF pathway.

Keywords miR-411-3p; hypoxia inducible factor 1 α /vascular endothelial growth factor; colorectal cancer; proliferation; migration; angiogenesis mimicry

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球范围内发病率和死亡率较高的消化道恶性肿瘤,其临床诊疗面临严峻挑战^[1]。CRC最显著的特征在于其潜伏期长且症状隐匿,早期病变往往缺乏特异性症状,往往会被误诊为普通肠炎或者功能性胃肠道疾病^[2-3]。当大多数患者出现排便习惯改变、便血或腹部不适等明显症状时,已发展为中晚期阶段,此时肿瘤细胞可能已通过血液和淋巴系统进行全身性转移,导致患者错过最佳治疗窗口期,即便采用最积极的综合治疗方案,五年生存率仍然较低且预后较差^[4-5]。因此,深入探索CRC分子机制并开发有效治疗策略对改善患者预后具有重要作用。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性非编码小分子RNA,其在细胞周期调控、分化进程、转移侵袭等肿瘤发生发展的关键环节中发挥重要作用^[6]。研究发现,过表达miR-411-3p能够通过调节活化T细胞核因子5抑制口腔鳞状细胞癌细胞的增殖和迁移^[7]。目前关于miR-411-3p在结直肠癌发病机制及进展中的分子机制尚未被完全阐明。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)是缺氧应答信号通路中的核心转录调控因子,其异常激活是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)过表达和血管生成的主要原因^[8]。研究表明,抑制HIF-1 α /VEGF通路,能够通过减少肝细胞癌的血管生成和上皮-间充质转化,抑制肿瘤进展^[9]。所以,本研究在人CRC细胞SW480中探讨miR-411-3p是否能够通过调控HIF-1 α /VEGF通路,影响CRC细胞增殖、迁移和血管生成拟态。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及相关仪器

人CRC细胞SW480(货号:CM-H089)购自盖宁生物科技(北京)有限公司;双荧光素酶报告基因测试盒(货号:SLDL-100)购自江莱生物科技有限公司;MTT检测试剂盒(货号:ZY5197)购自泽叶生物科技有限公司;结晶紫甲醇溶液(货号:SBJ-0605)购自南京森贝伽生物科技有限公司;凋亡检测试剂盒(货号:CSP061)购自上海中乔新舟生物科技有限公司;基质

胶(货号:354234)购自上海和序生物科技有限公司;多重免疫荧光试剂盒(货号:YB006)购自攸碧艾上海生物科技有限公司;Lip3000(Lipofectamine 3000, 货号:L3000015)购自上海鹿森生物工程有限公司;Ki67、CD31、VE-cadherin、HIF-1 α 、VEGF、E-cadherin、N-cadherin、GAPDH、Bax、cleaved caspase-3(货号:bs-2130R-1、bs-0195R-1、bs-0878R-1、K000487P、bs-0279R-1、BM0476、BM1678、bs-2188R-1、K001435M、9664S)购自上海恒斐生物科技有限公司;倒置荧光显微镜(货号:Revolve)购自艾普拜生物科技(苏州)有限公司;PCR仪(型号:Q3202-F)购自杭州柏恒科技有限公司;流式细胞仪(型号:MACSQuant[®]16)购自德国美天旎生物技术有限公司;酶标仪(型号:DNM-9602)购自上海帝博思生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染及分组干预 将培养的SW480细胞随机分为Control组(正常培养)、miR-NC组(转染miR-411-3p mimics阴性对照)、miR-411-3p mimics组(转染miR-411-3p mimics)、DMOG组(培养基加入2 mmol/L HIF-1 α /VEGF通路激活剂DMOG^[10])、miR-411-3p mimics+DMOG组(转染miR-411-3p mimics并加入2 mmol/L DMOG^[10])、miR-411-3p mimics+NC组(转染miR-411-3p mimics和pcDNA-HIF-1 α 阴性对照)、miR-411-3p mimics+HIF-1 α 组(转染miR-411-3p mimics和pcDNA-HIF-1 α),均使用Leibovitz L-15完全培养基在37 °C、5% CO₂培养箱中培养48 h后进行相关实验。

1.2.2 miR-411-3p与HIF-1 α 之间的靶向关系检测 为验证miR-411-3p与HIF-1 α 的靶向调控关系,构建HIF-1 α 野生型(HIF-1 α -WT)和突变型(HIF-1 α -MUT)表达载体,HIF-1 α -MUT主要通过定点诱变技术将与miR-411-3p的结合位点进行突变。实验分组设置对照组miR-NC(阴性对照miRNA)、处理组miR-411-3p mimics,采用Lip3000转染试剂将上述质粒与miRNA共转染至SW480细胞,在37 °C、5% CO₂条件下培养48 h后收集细胞样本,使用双荧光素酶报告基因测试盒进行处理后,测定并计算相对荧光素酶活性。

1.2.3 细胞增殖情况检测 MTT法: 使用96孔细胞培养板, 以 5×10^3 /孔的密度进行接种, 置于培养箱(37°C 、 $5\% \text{CO}_2$)中培养至细胞贴壁, 按照1.2.1实验设计分组处理48 h; 随后配制新鲜MTT工作液, 并每孔加入100 μL , 继续 37°C 孵育4 h, 然后终止反应, 使用酶标仪测定吸光度(D)值, 分析各组细胞存活率。

克隆形成实验: 将各组细胞以 1×10^3 /孔的密度接种于12孔板, 接种完成后轻缓摇晃培养板, 继续在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养, 培养周期为14天, 其间需定期在倒置显微镜下观察细胞生长状态及集落形成情况; 完成培养周期后, 弃掉孔内培养基, 加入多聚甲醛溶液(新鲜配制)室温固定20 min, 采用0.1%结晶紫染液室温染色20 min, 染色后的培养板置于显微镜下观察。

1.2.4 细胞凋亡情况检测 将细胞以 1×10^5 /孔的密度接种至6孔板, 经过1.2.1分组干预, 继续在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养48 h后, 使用胰蛋白酶在 37°C 条件下消化贴壁细胞3 min, 最终将细胞重悬于1 $\times$ 结合缓冲液中。取500 μL 细胞悬液加入流式检测管, 依次加入膜联蛋白V-FITC(5 μL)、碘化丙啶(5 μL), 所有操作均在避光条件下进行, 然后通过流式细胞仪进行检测, FlowJo软件分析各组细胞凋亡情况。

1.2.5 细胞迁移情况检测 使用6孔板作为实验载体, 将细胞按 5×10^4 /孔的密度进行接种, 按1.2.1分组处理后, 待细胞融合度达到80%~90%时进行划痕实验, 使用200 μL 枪头保持垂直角度施加均匀压力, 通过PBS轻柔冲洗2次, 更换为无血清培养基在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养, 观测时间点为0 h和处理后24 h。每次观测需在相同位置采集图像, 使用ImageJ软件分析并计算迁移率。

1.2.6 血管生成拟态(VM)形成情况检测 将冻存的基质胶置于 4°C 冰箱缓慢解冻。融化的基质胶与

培养基按1:1比例混合, 所有操作均在冰上完成, 然后加入50 μL 混合液至各孔, 在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中继续孵育30 min, 各组细胞悬液浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 每孔加入100 μL , 在标准培养条件(37°C 、 $5\% \text{CO}_2$)下培养48 h, 采用显微镜观察并对管状形成数量进行计数。

1.2.7 细胞Ki67、CD31、VE-cadherin表达检测 将各组细胞以 5×10^4 /孔密度接种于预先放置无菌玻璃爬片的6孔板中, 待细胞贴壁达到80%~90%时, 弃去培养基, 加入新鲜配制固定液, 室温固定20 min, 采用0.5% Triton X-100室温处理20 min, 使用5% BSA封闭液室温封闭30 min, 加入Ki67、CD31、VE-cadherin一抗(稀释比例1:200), 湿盒中孵育过夜(4°C), 次日回收一抗(稀释比例1:200), 选用对应种属荧光二抗(1:500), 避光条件下室温孵育1 h, 使用DAPI染液避光室温染核5 min, 激光共聚焦显微镜采集图像, 分析各组细胞荧光强度。

1.2.8 细胞miR-411-3p、HIF-1 α 、VEGF mRNA表达情况检测 收集生长状态稳定的各组细胞, 并使用Trizol试剂进行细胞裂解, 提取总RNA后, 测定RNA浓度及纯度(D_{260}/D_{280} 值为1.8~2.0), 按照反转录试剂盒标准流程, 配制20 μL 反应体系进行cDNA合成。以cDNA为模板继续配制反应体系进行扩增, 引物序列见表1。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算miR-411-3p、HIF-1 α 、VEGF的相对表达量, 以U6作为miR-411-3p的内参, GAPDH作为HIF-1 α 、VEGF的内参。

1.2.9 HIF-1 α /VEGF通路及细胞凋亡、迁移相关蛋白水平检测 采用改良型RIPA裂解缓冲液对各组细胞进行充分裂解30 min, 4°C 、12 000 r/min离心15 min后, 取上清液进行BCA蛋白定量检测, 上样等量蛋白并在恒压条件下电泳。PVDF膜预先用甲醇活化30 s, 恒定电流转膜。5% BSA室温封闭1.5 h, 封闭后用TBST溶液洗涤3次, 一抗HIF-1 α (1:1 000)、VEGF(1:1 500)、Bax(1:1 000)、

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因 Genes	上游引物(5'→3') Upstream primers (5'→3')	下游引物(5'→3') Downstream primers (5'→3')
miR-411-3p	CCG AGT ATG TAA CAC GGT C	TAT GTA ACA CGG TCC ACT AAC C
HIF-1 α	GAA CGT CGA AAA AAA AGT CTC G	CCT TAT CAA GAT GCG AAC TCA CA
VEGF	GGG CAG AAT CAT CAC GAA GT	AAA TGC TTT CTC CGC TCT GA
U6	CTC GCT TCG GCA GCA CA	ACG CTT CAC GAA TTT GCG TGT C
GAPDH	GGA GCG ATC CCT CCA AAA T	GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG

cleaved caspase-3(1:2 000)、E-cadherin(1:1 000)、N-cadherin(1:1 000)于4 °C缓慢振荡孵育过夜, 对应种属二抗(HRP标记)(1:5 000)室温孵育2 h。使用化学发光底物进行显影, ImageJ进行灰度值分析, 目标蛋白表达量以GAPDH为内参进行标准化。

1.3 统计学分析

所有实验均重复3次。所有数据分析处理均采用GraphPad Prism 9.0软件, 计量资料采用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)形式呈现, 多组间比较采用单因素方差分析; 事后检验选用SNK-*q*。当计算得出 $P<0.05$ 时, 判定组间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-411-3p与HIF-1α之间的靶向关系

通过网站StarBase进行生物信息学预测分析发现, miR-411-3p与HIF-1α存在特异性结合位点, 见图1。通过双荧光素酶报告实验发现, miR-NC组转染HIF-1α-WT后荧光素酶活性显著高于miR-411-3p mimics组($P<0.05$), 见表2。

2.2 过表达miR-411-3p对各组细胞增殖的影响

miR-411-3p mimics组与Control组、miR-NC组比较, 存活率、克隆形成数、Ki67荧光强度降低($P<0.05$); DMOG组与Control组比较, 克隆形成数、Ki67荧光强度增加($P<0.05$); miR-411-3p mimics+DMOG组与DMOG组比较, 存活率、克隆形成数、Ki67荧光强度降低($P<0.05$); miR-411-3p mimics+DMOG组与miR-411-3p mimics组比较, 存活率、克隆形成数、Ki67荧光强度升高($P<0.05$);

与miR-411-3p mimics组、miR-411-3p mimics+NC组比较, miR-411-3p mimics+HIF-1α组存活率、克隆形成数、Ki67荧光强度升高($P<0.05$)。见图2、图3和表3。

2.3 过表达miR-411-3p对各组细胞凋亡的影响

与Control组、miR-NC组相比, miR-411-3p mimics组细胞凋亡率以及Bax、cleaved caspase-3表达水平升高($P<0.05$); 与Control组相比, DMOG组细胞凋亡以及Bax、cleaved caspase-3表达水平降低($P>0.05$); 与DMOG组相比, miR-411-3p mimics+DMOG组细胞凋亡率以及Bax、cleaved caspase-3表达水平升高($P<0.05$); 与miR-411-3p mimics组相比, miR-411-3p mimics+DMOG组细胞凋亡率以及Bax、cleaved caspase-3表达水平降低($P<0.05$); 与miR-411-3p mimics组、miR-411-3p mimics+NC组比较, miR-411-3p mimics+HIF-1α组细胞凋亡率以及Bax、cleaved caspase-3表达水平降低($P<0.05$)。见图4和表4。

2.4 过表达miR-411-3p对各组细胞迁移的影响

miR-411-3p mimics组细胞迁移率、N-cadherin表达水平比Control组、miR-NC组低, E-cadherin表达水平比Control组、miR-NC组高($P<0.05$); DMOG组细胞迁移率、N-cadherin表达水平比Control组高, E-cadherin表达水平比Control组低($P<0.05$); miR-411-3p mimics+DMOG组细胞迁移率、N-cadherin表达水平比DMOG组低, E-cadherin表达水平比DMOG组高($P<0.05$); miR-411-3p mimics+DMOG组细胞迁移率、N-cadherin表达水平比miR-411-3p mimics组高, E-cadherin表达水平比miR-411-3p mimics组

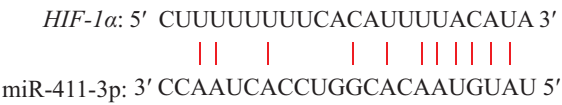


图1 miR-411-3p与HIF-1α结合位点的预测
Fig.1 Prediction of miR-411-3p binding sites to HIF-1α

表2 细胞荧光素酶活性比较
Table 2 Comparison of luciferase activities in cells

组别 Groups	HIF-1α-WT	HIF-1α-MUT
miR-NC	0.98±0.13	0.97±0.12
miR-411-3p mimics	0.42±0.06*	0.99±0.11

* $P<0.05$, 与miR-NC组相比。
* $P<0.05$ compared with miR-NC group.

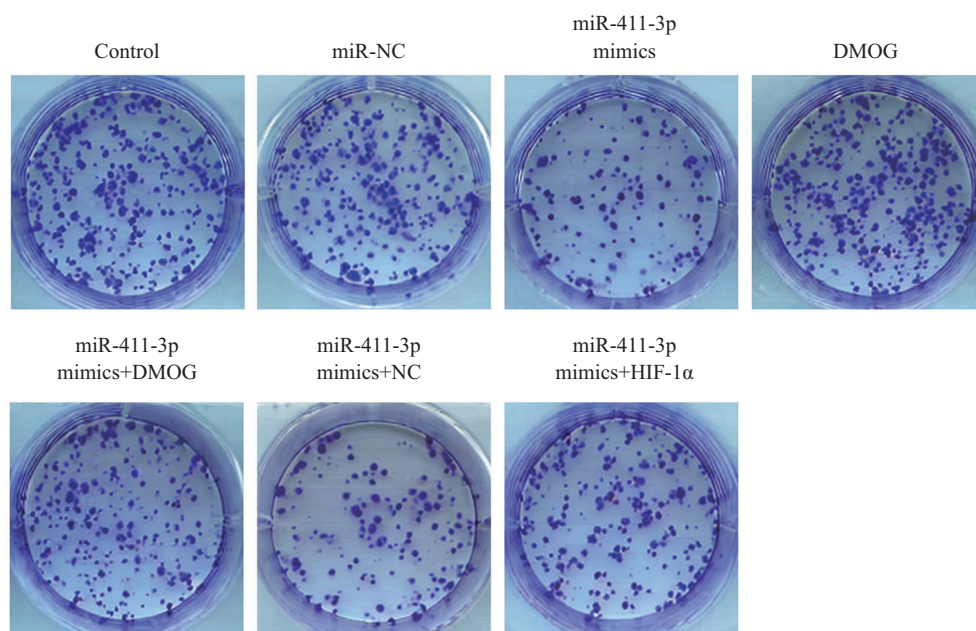


图2 各组细胞克隆形成数

Fig.2 Number of cell clones formed in each group

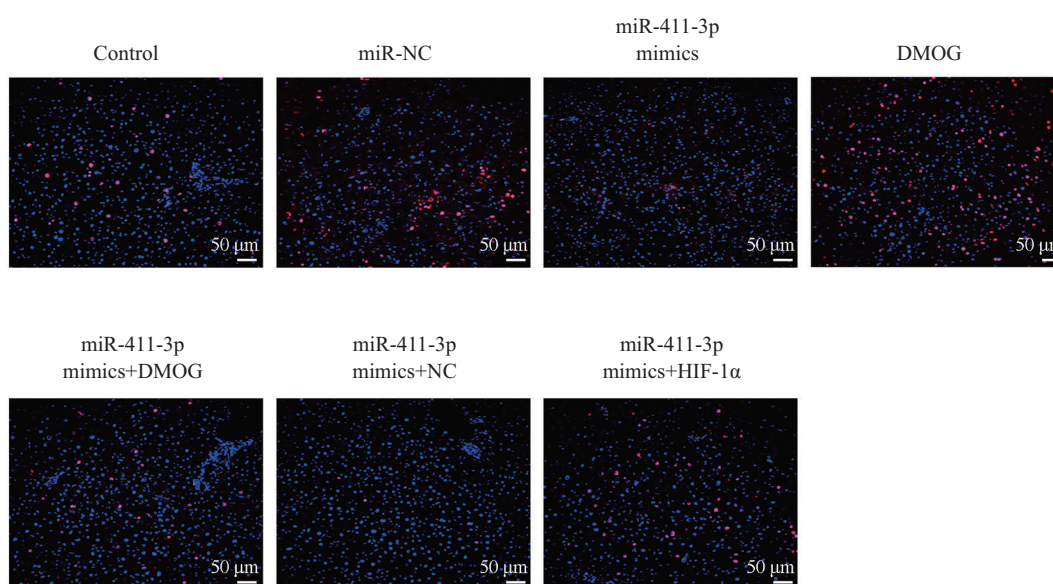


图3 免疫荧光检测各组细胞Ki67表达情况

Fig.3 Immunofluorescence detection of Ki67 expression in each group

低 ($P<0.05$); miR-411-3p mimics+HIF-1 α 组细胞迁移率、N-cadherin表达水平比miR-411-3p mimics组、miR-411-3p mimics+NC组高, E-cadherin表达水平比miR-411-3p mimics组、miR-411-3p mimics+NC组低 ($P<0.05$)。见图5、图6和表5。

2.5 过表达miR-411-3p对各组细胞VM形成以及CD31、VE-cadherin表达的影响

miR-411-3p mimics组细胞管腔结构数量以及

CD31、VE-cadherin荧光强度低于Control组、miR-NC组 ($P<0.05$); DMOG组细胞管腔结构数量以及CD31、VE-cadherin荧光强度高于Control组 ($P<0.05$); miR-411-3p mimics+DMOG组细胞管腔结构数量以及CD31、VE-cadherin荧光强度低于DMOG组 ($P<0.05$); miR-411-3p mimics+DMOG组细胞管腔结构数量以及CD31、VE-cadherin荧光强度高于miR-411-3p mimics组 ($P<0.05$); miR-411-3p mimics+HIF-

表3 各组细胞存活率、克隆形成数、Ki67荧光强度比较

组别	存活率/%	克隆形成数	Ki67荧光强度
Groups	Survival rate /%	Number of clones formed	Ki67 fluorescence intensity
Control	99.76±0.24	132.81±18.34	0.98±0.12
miR-NC	99.37±0.63	138.24±19.72	1.01±0.15
miR-411-3p mimics	52.69±7.95* [@]	65.78±10.29* [@]	0.41±0.05* [@]
DMOG	99.58±0.42	189.62±23.46*	1.46±0.17*
miR-411-3p mimics+DMOG	81.95±8.63* ^{&}	119.84±15.95* ^{&}	0.87±0.11* ^{&}
miR-411-3p mimics+NC	53.87±6.28	70.26±8.76	0.45±0.06
miR-411-3p mimics+HIF-1α	86.53±9.45* [§]	124.59±20.83* [§]	0.92±0.11* [§]

* $P<0.05$, 与Control组比较; [@] $P<0.05$, 与miR-NC组比较; [#] $P<0.05$, 与miR-411-3p mimics组比较; [&] $P<0.05$, 与DMOG组比较; [§] $P<0.05$, 与miR-411-3p mimics+NC组比较。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with Control group; [@] $P<0.05$ compared with miR-NC group; [#] $P<0.05$ compared with miR-411-3p mimics group; [&] $P<0.05$ compared with DMOG group; [§] $P<0.05$ compared with miR-411-3p mimics+NC group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

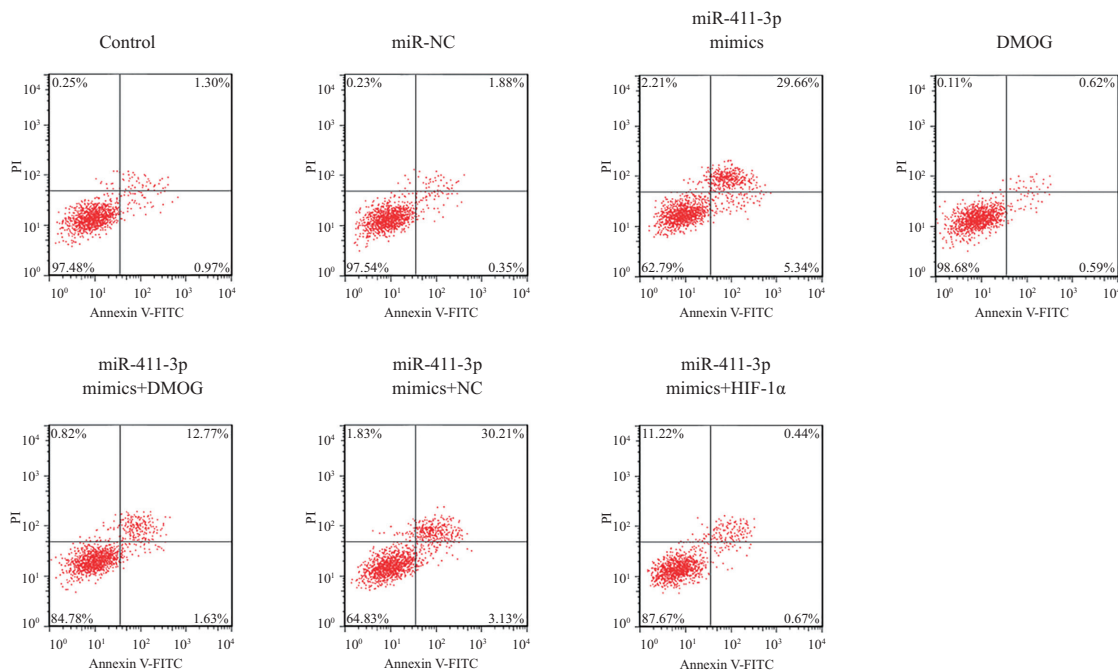


图4 各组细胞凋亡情况检测
Fig.4 Detection of cell apoptosis in each group

表4 各组细胞凋亡率比较

组别	凋亡率/%	Bax	Cleaved caspase-3
Groups	Apoptosis rate /%		
Control	2.52±0.19	0.35±0.05	0.29±0.03
miR-NC	2.43±0.21	0.37±0.04	0.31±0.04
miR-411-3p mimics	36.71±5.42* [@]	0.92±0.13* [@]	0.86±0.09* [@]
DMOG	1.58±0.16*	0.21±0.03*	0.18±0.02*
miR-411-3p mimics+DMOG	14.95±1.84* ^{&}	0.56±0.08* ^{&}	0.42±0.12* ^{&}
miR-411-3p mimics+NC	34.57±5.06	0.96±0.15	0.91±0.14
miR-411-3p mimics+HIF-1α	12.69±1.79* [§]	0.48±0.06* [§]	0.39±0.04* [§]

* $P<0.05$, 与Control组比较; [@] $P<0.05$, 与miR-NC组比较; [#] $P<0.05$, 与miR-411-3p mimics组比较; [&] $P<0.05$, 与DMOG组比较; [§] $P<0.05$, 与miR-411-3p mimics+NC组比较。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with Control group; [@] $P<0.05$ compared with miR-NC group; [#] $P<0.05$ compared with miR-411-3p mimics group; [&] $P<0.05$ compared with DMOG group; [§] $P<0.05$ compared with miR-411-3p mimics+NC group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

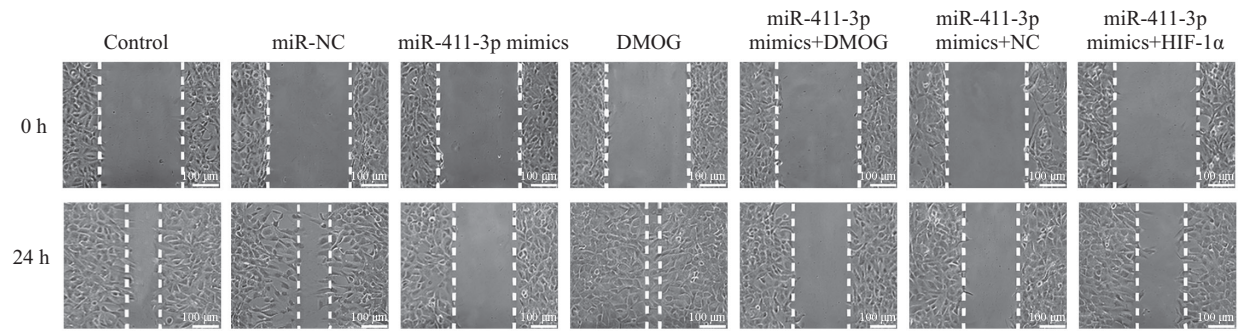


图5 各组细胞迁移情况
Fig.5 Cell migration in each group

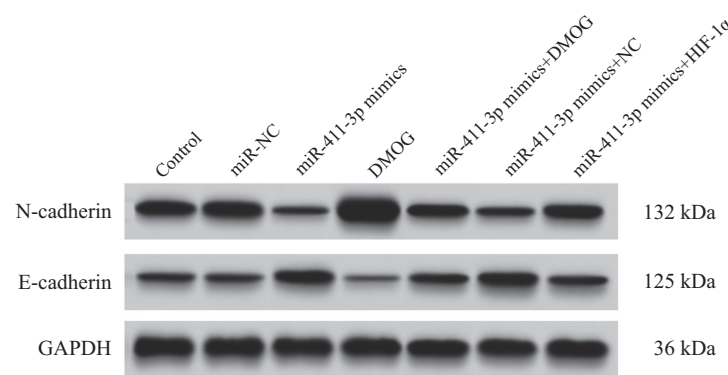


图6 各组细胞E-cadherin、N-cadherin蛋白表达情况
Fig.6 Protein expression of E-cadherin and N-cadherin in each group

表5 各组细胞迁移率、E-cadherin、N-cadherin表达情况比较
Table 5 Comparison of cell migration rate and expression of E-cadherin and N-cadherin in each group

组别 Groups	迁移率/% Mobility /%	N-cadherin	E-cadherin
Control	65.28±7.25	0.96±0.12	0.36±0.05
miR-NC	67.16±7.83	0.98±0.14	0.38±0.04
miR-411-3p mimics	24.84±5.39* [@]	0.34±0.06* [@]	0.92±0.13* [@]
DMOG	89.57±9.05*	1.46±0.18*	0.27±0.03*
miR-411-3p mimics+DMOG	51.72±6.52 ^{#&}	0.82±0.09 ^{#&}	0.61±0.08 ^{#&}
miR-411-3p mimics+NC	26.42±4.15	0.38±0.04	0.95±0.11
miR-411-3p mimics+HIF-1α	54.89±7.34 ^{#s}	0.79±0.08 ^{#s}	0.57±0.07 ^{#s}

* $P<0.05$, 与Control组比较; [@] $P<0.05$, 与miR-NC组比较; [#] $P<0.05$, 与miR-411-3p mimics组比较; ^{*} $P<0.05$, 与DMOG组比较; ^s $P<0.05$, 与miR-411-3p mimics+NC组比较。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with Control group; [@] $P<0.05$ compared with miR-NC group; [#] $P<0.05$ compared with miR-411-3p mimics group; ^{*} $P<0.05$ compared with DMOG group; ^s $P<0.05$ compared with miR-411-3p mimics+NC group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

1α组细胞管腔结构数量以及CD31、VE-cadherin 荧光强度高于miR-411-3p mimics组、miR-411-3p mimics+NC组。见图7~图9和表6。

2.6 过表达miR-411-3p对各组细胞miR-411-3p以及HIF-1α、VEGF mRNA和蛋白表达的影响

miR-411-3p mimics组与Control组、miR-NC组比较, miR-411-3p表达水平增加, HIF-1α、VEGF

mRNA及蛋白表达水平降低 ($P<0.05$); DMOG组与Control组比较, miR-411-3p表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), HIF-1α、VEGF mRNA及蛋白表达水平增加 ($P<0.05$); miR-411-3p mimics+DMOG与DMOG组比较, miR-411-3p表达水平增加, HIF-1α、VEGF mRNA及蛋白表达水平降低 ($P<0.05$); miR-411-3p mimics+DMOG与miR-411-3p mimics组比较, miR-

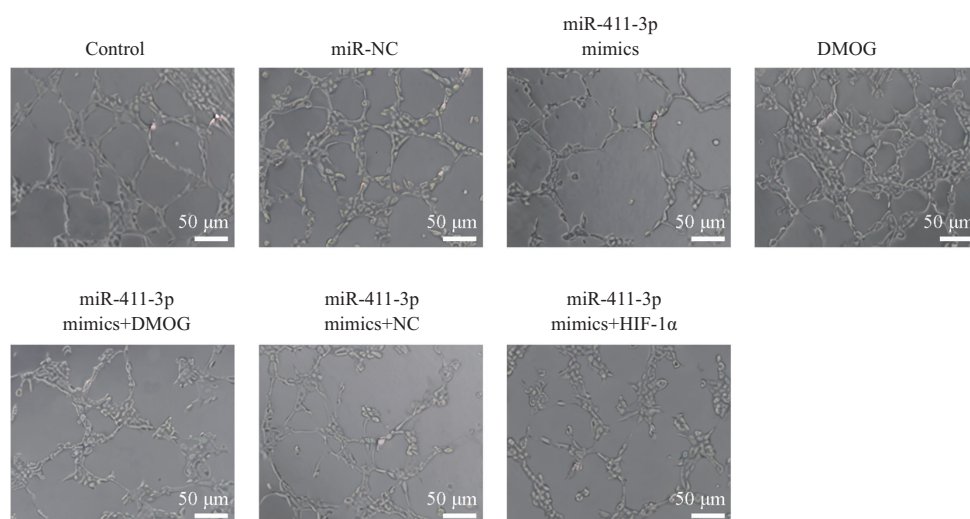


图7 各组细胞VM形成情况
Fig.7 Formation of VM in each group

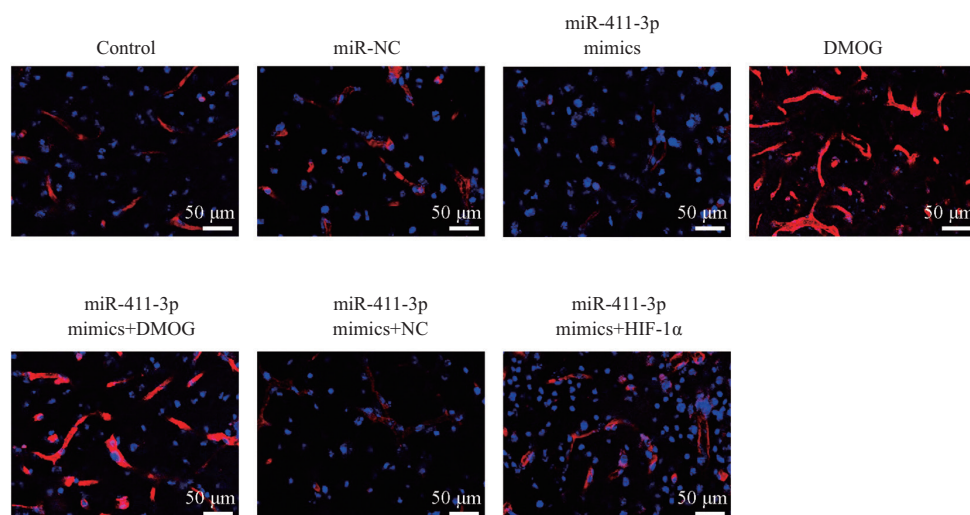


图8 免疫荧光检测各组细胞CD31表达情况
Fig.8 Immunofluorescence detection of CD31 expression in each group

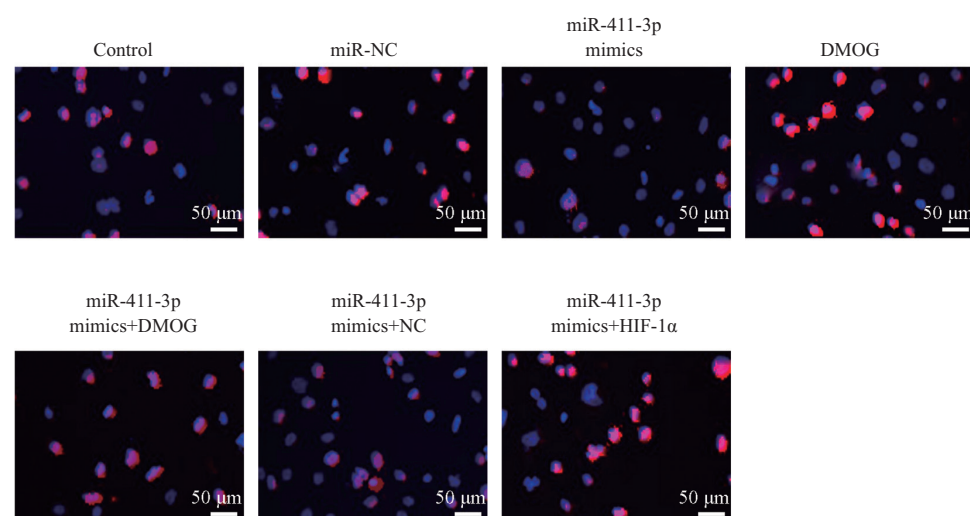


图9 免疫荧光检测各组细胞VE-cadherin表达情况
Fig.9 Immunofluorescence detection of VE-cadherin expression in each group

表6 各组细胞管腔结构数量以及CD31、VE-cadherin表达情况比较

Table 6 Comparison of the number of luminal structures, CD31 and VE-cadherin expression in each group

组别 Groups	管腔结构数量 Number of luminal structures	CD31荧光强度 Fluorescence intensity of CD31	VE-cadherin荧光强度 Fluorescence intensity of VE-cadherin
Control	26.75±3.41	0.95±0.11	0.98±0.12
miR-NC	28.37±3.95	0.96±0.13	1.01±0.14
miR-411-3p mimics	8.64±1.58* [@]	0.42±0.06* [@]	0.46±0.05* [@]
DMOG	38.29±5.26*	1.53±0.17*	1.46±0.15*
miR-411-3p mimics+DMOG	21.82±3.69* ^{&}	1.04±0.15* ^{&}	0.91±0.11* ^{&}
miR-411-3p mimics+NC	10.29±1.46	0.47±0.05	0.42±0.06
miR-411-3p mimics+HIF-1α	24.95±3.67* [§]	0.94±0.12* [§]	0.95±0.13* [§]

* $P<0.05$, 与Control组比较; @ $P<0.05$, 与miR-NC组比较; # $P<0.05$, 与miR-411-3p mimics组比较; & $P<0.05$, 与DMOG组比较; § $P<0.05$, 与miR-411-3p mimics+NC组比较。 $n=6$, $\bar{x} \pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with Control group; @ $P<0.05$ compared with miR-NC group; # $P<0.05$ compared with miR-411-3p mimics group; & $P<0.05$ compared with DMOG group; § $P<0.05$ compared with miR-411-3p mimics+NC group. $n=6$, $\bar{x} \pm s$ 。

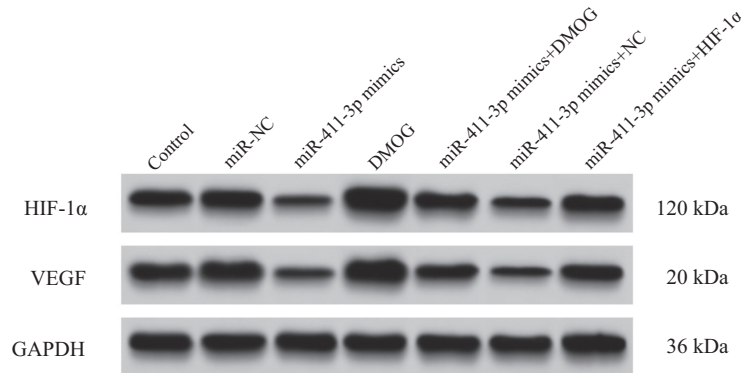


图10 各组细胞HIF-1α、VEGF蛋白表达情况

Fig.10 Protein expression of HIF-1α and VEGF in each group

表7 各组细胞miR-411-3p以及HIF-1α、VEGF mRNA和蛋白表达情况比较

Table 7 Comparison of miR-411-3p, as well as HIF-1α and VEGF mRNA and protein expression in each group of cells

组别 Groups	miR-411-3p	HIF-1α mRNA	VEGF mRNA	HIF-1α	VEGF
Control	0.98±0.15	1.03±0.12	0.99±0.11	0.97±0.13	0.98±0.12
miR-NC	0.99±0.13	1.01±0.14	1.02±0.16	0.99±0.11	1.01±0.13
miR-411-3p mimics	1.86±0.23* [@]	0.39±0.05* [@]	0.43±0.06* [@]	0.46±0.06* [@]	0.42±0.05* [@]
DMOG	1.01±0.12	1.68±0.21*	1.56±0.18*	1.54±0.18*	1.49±0.16*
miR-411-3p mimics+DMOG	1.83±0.19* ^{&}	0.87±0.09* ^{&}	0.91±0.12* ^{&}	0.94±0.13* ^{&}	0.89±0.12* ^{&}
miR-411-3p mimics+NC	1.72±0.19	0.44±0.06	0.45±0.05	0.42±0.04	0.46±0.05
miR-411-3p mimics+HIF-1α	1.81±0.18	0.98±0.12* [§]	1.01±0.13* [§]	0.99±0.15* [§]	0.95±0.12* [§]

* $P<0.05$, 与Control组比较; @ $P<0.05$, 与miR-NC组比较; # $P<0.05$, 与miR-411-3p mimics组比较; & $P<0.05$, 与DMOG组比较; § $P<0.05$, 与miR-411-3p mimics+NC组比较。 $n=6$, $\bar{x} \pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with Control group; @ $P<0.05$ compared with miR-NC group; # $P<0.05$ compared with miR-411-3p mimics group; & $P<0.05$ compared with DMOG group; § $P<0.05$ compared with miR-411-3p mimics+NC group. $n=6$, $\bar{x} \pm s$ 。

411-3p表达差异无统计学意义($P>0.05$), HIF-1α、VEGF mRNA及蛋白表达水平增加($P<0.05$)。miR-411-3p mimics+HIF-1α组与miR-411-3p mimics组、miR-411-3p mimics+NC组比较, miR-411-3p表达差异无统计学意义($P>0.05$), HIF-1α、VEGF mRNA及

蛋白表达水平增加($P<0.05$)。见图10和表7。

3 讨论

CRC作为消化系统常见恶性肿瘤, 其生存预期呈现出显著临床分期依赖性特征, 早期确诊患者五

年生存率较高,而进展期患者由于肿瘤发生淋巴结转移或远处转移,其经过治疗后容易复发且病情恶化^[11-12]。因此,探索CRC转移相关分子机制及潜在新型标志物对改善患者生存预后至关重要。

近年来,miRNA在肿瘤生物学中的调控作用日益受到学界关注,其作为重要的表观遗传调控因子,广泛参与肿瘤发生发展的关键环节^[13]。其中,miR-411-3p已被证实参与多种恶性肿瘤的病理进程。HUANG等^[14]研究发现,过表达miR-411-3p能够抑制神经胶质瘤细胞增殖,诱导凋亡。BAI等^[15]研究表明,敲低miR-411-3p可上调基质金属蛋白酶-7,诱导M2巨噬细胞极化,促进CRC的恶性生物学进展。本研究结果显示,过表达miR-411-3p,细胞存活率、克隆形成数、增殖蛋白Ki67表达水平降低,凋亡率、Bax、cleaved caspase-3表达水平升高,提示上调miR-411-3p能够抑制CRC细胞增殖,促进凋亡。上皮-间充质转化是恶性肿瘤发生发展过程中的关键机制,在肿瘤转移过程中扮演决定性角色,其异常激活与结肠癌患者预后不良及治疗抵抗显著相关^[16-17]。本研究结果显示,过表达miR-411-3p后,细胞迁移率、N-cadherin表达水平降低,E-cadherin表达水平升高,提示上调miR-411-3p能够抑制CRC细胞迁移,延缓CRC进展。这些研究结果表明,miR-411-3p过表达能够抑制CRC细胞增殖和迁移,诱导凋亡,其可能作为CRC的潜在治疗靶点。

前期基于生物信息学预测发现,HIF-1 α 存在与miR-411-3p互补的特异性结合位点,本研究结果经过双荧光素酶报告实验进一步证实。HIF-1 α /VEGF通路在肿瘤微环境和血管生成方面起关键作用^[18]。在缺氧条件下,HIF-1 α 的异常激活会显著促进其下游关键效应因子VEGF的表达与分泌;VEGF水平升高进一步促进血管内皮细胞迁移、增殖,并增强血管通透性,从而协同促进血管生成,而新生血管则成为肿瘤细胞血行转移的主要通道^[19]。MA等^[20]研究表明,青蒿琥酯通过抑制HIF-1 α /VEGF通路,抑制脉络膜黑色素瘤迁移、侵袭,减少VM形成。FANG等^[21]研究说明,阻断HIF-1 α /VEGF通路,能够抑制血管生成,显著抑制CRC肿瘤细胞生长。本研究结果显示,上调miR-411-3p表达后,细胞HIF-1 α 、VEGF mRNA及蛋白表达水平降低,管腔结构数量以及CD31、VE-cadherin荧光强度降低,提示miR-411-3p可能通过调控HIF-1 α /VEGF通路,减少VM形成,进而抑制CRC

进展。为进一步研究mi-411-3p与HIF-1 α /VEGF通路之间的关系,本研究引入HIF-1 α /VEGF通路激活剂DMOG,通过单独使用DMOG处理SW480细胞发现,细胞克隆形成数、迁移率以及管腔结构数量增加,提示HIF-1 α /VEGF通路可能与CRC的增殖、迁移以及VM形成密切相关。本研究继续通过转染miR-411-3p mimics质粒和DMOG同时处理发现,DMOG逆转上调miR-411-3p对CRC细胞增殖、迁移以及VM形成的抑制作用。这些结果说明,miR-411-3p可能通过调节HIF-1 α /VEGF通路对CRC细胞增殖、迁移和VM产生影响。

综上所述,上调miR-411-3p可能通过抑制HIF-1 α /VEGF通路,抑制CRC细胞增殖、迁移以及VM,为开发基于miRNA的靶向治疗策略提供实验依据。然而,miR-411-3p的表达呈现出显著的组织特异性,可能通过多靶点调控不同的通路;本研究基于体外实验,缺乏体内实验进一步验证。因此,我们后续将继续深入探究其在不同CRC细胞系以及结肠癌动物模型中的作用机制。

作者贡献

刘宇关负责研究设计、数据收集、论文撰写;刘林涛和徐博负责数据分析、文献查找、论文修改;王茂楠负责论文审校。

参考文献 (References)

- [1] ABEDIZADEH R, MAJIDI F, KHORASANI H R, et al. Colorectal cancer: a comprehensive review of carcinogenesis, diagnosis, and novel strategies for classified treatments [J]. Cancer Metastasis Rev, 2024, 43(2): 729-53.
- [2] 刘志昱, 李纪鹏. 一个具有潜力的结直肠癌预后指标——FPR[J]. 重庆医学 (LIU Z Y, LI J P. A potential prognostic indicator for colorectal cancer: FPR [J]. Chongqing Med), 2023, 52(S01): 229-31.
- [3] SHEN Q, ZHOU Y, LIU X, et al. Clinical and genetic characteristics of pediatric colorectal cancer [J]. Pediatr Blood Cancer, 2025, 72(4): e31569-77.
- [4] ANDREI P, BATTUELLO P, GRASSO G, et al. Integrated approaches for precision oncology in colorectal cancer: the more you know, the better [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 84(4): 199-213.
- [5] LU Q, JIANG J, WANG X, et al. Advancements in the research of astragalus membranaceus for the treatment of colorectal cancer [J]. Am J Chin Med, 2025, 53(1): 119-46.
- [6] LIU Y, YANG Y, WANG X, et al. Function of microRNA-124 in the pathogenesis of cancer (review) [J]. Int J Oncol, 2024, 64(1): 6-26.
- [7] FU S W, ZHANG Y, LI S, et al. LncRNA TTN-AS1 promotes the

- progression of oral squamous cell carcinoma via miR-411-3p/NFAT5 axis [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(8): 415-27.
- [8] BAHAMIN N, RAFIEIAN-KOPAEI M, AHMADIAN S, et al. Combined treatment with alhagi maurorum and docetaxel inhibits breast cancer progression via targeting HIF-1 α /VEGF mediated tumor angiogenesis *in vivo* [J]. *Heliyon*, 2023, 9(5): e16292.
- [9] LU S, CAI Y, KANG T, et al. Arsenic sulfide inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by suppressing the HIF-1 α /VEGF pathway [J]. *Front Biosci*, 2023, 28(7): 152-62.
- [10] 田园园, 吴倍, 王飞, 等. 纳布啡调节HIF-1 α /VEGF信号通路对结直肠癌细胞活性和血管生成的影响[J]. 中国现代普通外科进展(TIAN Y Y, WU B, WANG F, et al. Effects of nalbuphine on the activity and angiogenesis of colorectal cancer cells by regulating HIF-1 α /VEGF signaling pathway [J]. *Progress of Modern General Surgery in China*), 2024, 27(10): 760-5.
- [11] ABEDIZADEH R, MAJIDI F, KHORASANI H R, et al. Colorectal cancer: a comprehensive review of carcinogenesis, diagnosis, and novel strategies for classified treatments [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2024, 43(2): 729-53.
- [12] ZYGULSKA A L, PIERZCHALSKI P. Novel diagnostic biomarkers in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 852.
- [13] MENON A, ABD-AZIZ N, KHALID K, et al. miRNA: a promising therapeutic target in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11502-30.
- [14] HUANG T, CHEN Y, ZENG Y, et al. Long non-coding RNA PS-MA3-AS1 promotes glioma progression through modulating the miR-411-3p/HOXA10 pathway [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 844-53.
- [15] BAI T, LI P, LIU Y, et al. Knockdown of miR-411-3p induces M2 macrophage polarization and promotes colorectal cancer progression by regulation of MMP7 [J]. *Eur J Histochem*, 2025, 69(2): 4178-89.
- [16] 王旭, 万林鹭, 殷启航, 等. 黄芪总皂苷调控Wnt3a/ β -catenin/EMT通路抑制结肠癌肝转移的作用机制[J]. 中华中医药杂志(WANG X, WAN L L, YIN Q H, et al. Astragaloside inhibits liver metastasis of colon cancer by regulating Wnt3a/ β -catenin/EMT pathway [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*), 2024, 39(4): 1763-8.
- [17] 杨琦, 孙正, 朱亦邈, 等. 黄芪-莪术配伍调控EMT对结肠癌HT-29细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响[J]. 中国中药杂志(YANG Q, SUN Z, ZHU Y M, et al. Effect of Astragalus membranaceus and Zedoary turmeric on the proliferation, migration and invasion of colon cancer HT-29 cells by regulating EMT [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*), 2023, 48(3): 736-43.
- [18] JIANG D, QI Z, XU Z Y, et al. F13B regulates angiogenesis and tumor progression in hepatocellular carcinoma via the HIF-1 α /VEGF pathway [J]. *Biomol Biomed*, 2024, 25(1): 189-209.
- [19] ZHANG J, DENG Y T, LIU J, et al. Role of transforming growth factor- β 1 pathway in angiogenesis induced by chronic stress in colorectal cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2024, 25(1): 2366451-63.
- [20] MA Q Y, XU X Y, ZHU Y Z, et al. Artesunate inhibits vasculogenic mimicry in choroidal melanoma through HIF-1 α /VEGF/PDGF pathway [J]. *Acta Histochem*, 2024, 126(5/6/7): 152174-84.
- [21] FANG C, DAI L, WANG C, et al. Secretogranin II impairs tumor growth and angiogenesis by promoting degradation of hypoxia-inducible factor-1 α in colorectal cancer [J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(12): 3513-26.