

[文章编号] 1671-587X(2024)04-0947-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240408

下调 miR-208a 通过靶向 SFRP1 介导 Wnt 信号通路对结直肠癌 细胞 5-FU 耐药的改善作用

胡兵兵¹, 罗康宁², 彭肃², 周煜中², 陈茂良², 刘昌化²

(1. 南华大学衡阳医学院附属第二医院血管疝儿外科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学衡阳医学院附属
第二医院胃肠外科, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] **目的:** 探讨下调微小RNA-208a (miR-208a) 对结直肠癌细胞5-氟尿嘧啶 (5-FU) 耐药的影响, 阐明其相关分子机制。**方法:** 采用实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 法检测结直肠癌5-FU耐药细胞株 HT-29/5-FU 及其亲本 HT-29 细胞中 miR-208a 和分泌型卷曲相关蛋白1 (SFRP1) mRNA 表达水平。以 HT-29/5-FU 细胞为研究对象, 将 miR-208a 抑制物 (miR-208a inhibitor) 质粒及其阴性对照质粒 (inhibitor-NC) 和 SFRP1 小干扰质粒 (si-SFRP1) 及其阴性对照质粒 (si-NC) 分别或同时转染至 HT-29/5-FU 细胞中, 联合 5-FU 处理, 将细胞分为空白组、inhibitor-NC 组、miR-208a inhibitor 组、miR-208a inhibitor+si-NC 组和 miR-208a inhibitor+si-SFRP1 组。MTT 法检测各组细胞增殖活性并计算耐药指数, Annexin V-FITC/PI 双染法结合流式细胞术检测不同浓度 5-FU 作用后各组细胞凋亡率, Western blotting 法检测各组细胞中 SFRP1、 β -连环蛋白 (β -catenin)、P-糖蛋白 (P-gp) 和 ATP 结合盒 B 亚家族成员 1 转运蛋白 (ABCB1) 蛋白表达水平。双荧光素酶报告基因实验验证 miR-208a 与 SFRP1 的靶向关系。**结果:** 与 HT-29 细胞比较, HT-29/5-FU 细胞中 miR-208a 表达水平升高 ($P < 0.05$), SFRP1 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$)。与 inhibitor-NC 组比较, miR-208a inhibitor 组细胞增殖活性降低 ($P < 0.05$), 耐药指数降低, 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), 细胞中 β -catenin、P-gp 和 ABCB1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因实验提示 SFRP1 是 miR-208a 靶基因, 且 miR-208a 可负向调控 SFRP1 的表达。与 miR-208a inhibitor+si-NC 组比较, miR-208a inhibitor+si-SFRP1 组细胞增殖活性升高 ($P < 0.05$), 耐药指数升高, 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$), 细胞中 β -catenin、P-gp 和 ABCB1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。**结论:** 下调 miR-208a 可通过靶向上调 SFRP1 表达抑制 Wnt 信号通路的转导, 进而改善 HT-29/5-FU 细胞对 5-FU 的耐药。

[关键词] 结直肠肿瘤; 微小RNA-208a; 分泌型卷曲相关蛋白1; Wnt 信号通路; 5-氟尿嘧啶; 耐药性

[中图分类号] R735.1 **[文献标志码]** A

Improvement effect of down-regulation of miR-208a on 5-FU resistance in colorectal cancer cells through targeting SFRP1 for mediating Wnt signaling pathway

HU Bingbing¹, LUO Kangning², PENG Su², ZHOU Yuzhong², CHEN Maoliang², LIU Changhua²

(1. Department of Vascular Hernia Pediatric, Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical School,

[收稿日期] 2023-08-03

[基金项目] 湖南省科技厅创新型省份建设专项科普专题项目 (2022ZK4289); 湖南省卫健委科研项目 (202204013770, 202204014806)

[作者简介] 胡兵兵 (1986-), 男, 湖南省衡阳市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事胃肠肿瘤基础和临床方面的研究。

[通信作者] 罗康宁, 主治医师 (E-mail: lkn1987622@126.com)

University of South China, Hengyang 421001, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of downregulating microRNA-208a (miR-208a) on the resistance of the colorectal cancer cells to 5-fluorouracil (5-FU), and to clarify its related molecular mechanism. **Methods:** Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of miR-208a and secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) mRNA in the 5-FU-resistant colorectal cancer cell line HT-29/5-FU and its parent HT-29 cells. The HT-29/5-FU cells were transfected with miR-208a inhibitor plasmid and its negative control plasmid (inhibitor-NC), and SFRP1 small interfering RNA (si-SFRP1) and its negative control plasmid (si-NC), either separately or in combination, followed by treatment with 5-FU. The cells were divided into inhibitor-NC group, miR-208a inhibitor group, miR-208a inhibitor+si-NC group, and miR-208a inhibitor+si-SFRP1 group. MTT assay was used to detect the proliferation activities of the cells and the resistance indexes were calculated; Annexin V-FITC/PI double staining and flow cytometry were used to detect the apoptotic rates of the cells after treated with different concentrations of 5-FU; Western blotting method was used to detect the expression levels of SFRP1, β -catenin, P-glycoprotein (P-gp), and ATP-binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) proteins in the cells in various groups; dual-luciferase reporter gene assay was used to validate the targeting relationship between miR-208a and SFRP1. **Results:** Compared with HT-29 cells, the expression level of miR-208a in the HT-29/5-FU cells was increased ($P < 0.05$), and the expression level of SFRP1 mRNA was decreased ($P < 0.05$). Compared with inhibitor-NC group, the proliferation activity of the cells in miR-208a inhibitor group was decreased ($P < 0.05$), the resistance index was decreased, the apoptotic rate was increased ($P < 0.05$), and the expression levels of β -catenin, P-gp, and ABCB1 proteins in the cells were decreased ($P < 0.05$). The dual-luciferase reporter gene assay results showed that SFRP1 was a target gene of miR-208a and miR-208a could negatively regulate the expression of SFRP1. Compared with miR-208a inhibitor+si-NC group, the proliferation activity of the cells in miR-208a inhibitor+si-SFRP1 group was increased ($P < 0.05$), the resistance index was increased, the apoptotic rate was decreased ($P < 0.05$), and the expression levels of β -catenin, P-gp, and ABCB1 proteins in the cells were increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Downregulation of miR-208a can improve the resistance of the HT-29/5-FU cells to 5-FU by targeting and upregulating the SFRP1 expression, thereby inhibiting the transmission of the Wnt signaling pathway.

KEYWORDS Colorectal neoplasm; MicroRNA-208a; Secreted crimp-related protein 1; Wnt signaling pathway; 5-fluorouracil; Drug resistance

近年来,结直肠癌已成为世界第二大癌症致死病因^[1],其临床治疗方法主要包括手术切除和化疗等,但化疗药物的长期使用产生的耐药性会导致治疗效果较差,患者生存期不能得到有效延长^[2-3]。为此,深入探索结直肠癌耐药相关的异常表达基因、信号通路和分子机制,将有助于发掘潜在的结直肠癌耐药治疗靶点。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类由内源基因编码的长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子,与多种肿瘤细胞恶性发展关系密切。研究^[4-6]表明:miR-208a参与调控乳腺癌、非小细胞肺癌和骨肉瘤发生发展过程。分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled-

related protein, SFRP) 1是SFRP家族一员,参与多种信号通路的调控,进而影响细胞的生化、分化和凋亡等进程,且SFRP1是miR-208a的靶基因之一。王晓凤等^[7]研究显示:SFRP1在肺癌组织中低表达,其过表达可明显抑制肺癌A549细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭等恶性表型。但miR-208a是否通过靶向SFRP1介导Wnt信号通路进而调控结直肠癌细胞5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)耐药目前尚不明确。本研究探讨miR-208a对人结直肠癌5-FU耐药株HT-29/5-FU细胞耐药性的影响及其分子机制,为改善结直肠癌5-FU耐药提供潜在的分子靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂 人结肠癌 HT-29 细胞株购自中国科学院上海细胞库, 人结直肠癌 5-FU 耐药细胞株 HT-29/5-FU 由本课题组前期构建, 5-FU 对亲本 HT-29 细胞的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 为 $19.48 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ [8]。RPMI-1640 培养基、Opti-MEM 培养基和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司, 5-FU、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、噻唑蓝 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒和 Lipo8000™ 转染试剂购自上海碧云天生物技术有限公司, miR-208 抑制物 (miR-208a inhibitor) 及其阴性对照质粒 (inhibitor-NC)、miR-208a 模拟物 (miR-208a mimics) 和 SFRP1 小干扰质粒 (si-SFRP1) 及其阴性对照质粒 (si-NC) 由广州锐博生物技术有限公司提供, Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、细胞总蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒和高灵敏 ECL 发光检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, SFRP1 抗体、 β -连环蛋白 (β -catenin) 抗体、P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 抗体和 ATP 结合盒 B 亚家族成员 1 转运蛋白 (ATP-binding cassette subfamily B member 1, ABCB1) 抗体购自英国 Affinity 公司, GAPDH 抗体和 HRP 酶标记的亲纯山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗购自美国 Proteintech 公司。

1.2 细胞培养、转染和分组 HT-29 细胞和 HT-29/5-FU 细胞采用含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养过夜。胰酶消化对数生长期 HT-29/5-FU 细胞, 加入完全培养基重悬细胞并调整细胞密度为 $3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 将细胞以每孔 2 mL 接种至 6 孔细胞培养板中, 置于培养箱中培养过夜, 待细胞融合度达到 70%~80% 时, 参照 Lipo8000™ 转染试剂说明书, 结合 Opti-MEM 培养基进行以下 2 个转染实验: ① 将细胞分为空白组 (不进行转染)、inhibitor-NC 组 (转染 inhibitor-NC) 和 miR-208a inhibitor 组 (转染 miR-208a inhibitor)。② 将细胞分为 inhibitor-NC 组、miR-208a inhibitor 组、miR-208a inhibitor+si-NC 组 (共转染 miR-208a inhibitor 和 si-NC) 及 miR-208a inhibitor+si-SFRP1 组 (共转染 miR-208a inhibitor 和 si-SFRP1)。8 h 后更换新鲜 RPMI-1640 完全培养基, 转染 48 h 收集细胞采用实时荧光定量 PCR

(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 法检测细胞转染效果, 转染成功的细胞用于后续实验。

1.3 MTT 法检测各组细胞增殖活性、 IC_{50} 和耐药指数 收集转染后的各组 HT-29/5-FU 细胞, 以每孔 3×10^3 个细胞接种至 96 孔细胞培养板中, 同时设置调零孔 (培养基对照), 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养过夜。加入不同浓度 (0、5、10、20、40、80 和 $160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 5-FU 处理各组细胞 24 h。于检测前 4 h, 向每孔加入 20 μL MTT ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶液, 继续培养 4 h, 弃培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 室温避光震荡 10 min, 采用酶标仪检测 490 nm 波长处吸光度 (A) 值, 以 A 值代表各组细胞增殖活性。细胞增殖率 = (实验孔 A 值 - 调零孔 A 值) / (空白对照孔 A 值 - 调零孔 A 值) $\times 100\%$ 。采用 SPSS 软件根据细胞增殖率计算细胞 IC_{50} 。计算耐药指数, 耐药指数 = HT-29/5FU 细胞 IC_{50} / HT-29 细胞 IC_{50} 。

1.4 Annexin V-FITC/PI 双染法结合流式细胞术检测各组细胞凋亡率 收集转染后的各组 HT-29/5-FU 细胞, 以每孔 3×10^5 个细胞密度接种至 6 孔细胞培养板中, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养过夜。加入不同浓度 (0 和 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 5-FU 处理各组细胞 24 h 后, 按处理方法不同分为空白组、inhibitor-NC 组、miR-208 inhibitor 组、5-FU 组、inhibitor-NC+5-FU 组和 miR-208 inhibitor+5-FU 组, 各组收集 1×10^5 个细胞, 加入 200 μL Annexin V-FITC 结合液重悬, 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀, 再加入 10 μL PI 染液混匀, 室温避光孵育 20 min, 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。细胞凋亡率 = 凋亡细胞数 / 细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.5 RT-qPCR 法检测各组细胞中 miR-208a 和 SFRP1 mRNA 表达水平 收集各组细胞, 冷 PBS 缓冲液清洗 1 次后, 加入 Trizol 提取细胞中总 RNA, 采用 PrimeScript RT reagent Kit 将总 RNA 逆转录为 cDNA, 再分别采用 TB Green Fast qPCR Mix 和 MirX miRNA qRT-PCT TB Green Kit 试剂盒进行检测。引物序列: miR-208a, F 5'-CGCGGCATAAGACGAGCAAAAAGC-3', R 5'-ACGACAGTTCAACGGCAGCACCG-3'; SFRP1, F 5'-CCAATCGATGCCCCATC-3', R 5'-GAA-CGAGGTCAAGCTCTACA-3'; U6, F 5'-ATC-

GCCTTCGGCAGCACA-3', R 5'-CACGCTGC-ACGAATTCGCGT-3'; GAPDH, F 5'-AGCCC-AAGATGCCCTTCAGT-3', R 5'-CCGTGTTC-CTACCCCAATG-3'。90 °C预变性 3 min; 90 °C变性 30 s, 55 °C退火 30 s, 75 °C延伸 30 s, 40个循环。分别以 U6 和 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-208a 和 SFRP1 mRNA 表达水平。

1.6 Western blotting 法检测各组细胞中 SFRP1、 β -catenin、P-gp 和 ABCB1 蛋白表达水平 收集各组转染后的细胞, 冷 PBS 清洗 1 次后, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取各组细胞中总蛋白, 采用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。取 30 μ g 总蛋白上样, 通过凝胶电泳将蛋白分离并转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 置于 5 g·L⁻¹ 脱脂牛奶中封闭 1 h, 加入 SFRP1 抗体 (1:1 000)、 β -catenin 抗体 (1:1 000)、P-gp 抗体 (1:1 000)、ABCB1 抗体 (1:1 000) 和 GAPDH 抗体 (1:10 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 清洗 3 次, 加入 HRP 酶标记的亲纯化山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗 (1:5 000), 室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次, 滴加 ECL 显影液曝光。采用 Image J 软件分析各组蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH 蛋白条带灰度值。

1.7 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-208a 与 SFRP1 的靶向关系 采用 miRDB 在线数据库预测 miR-208a 的靶基因。设计并合成含有 miR-208a 结合位点的 SFRP1 野生型 (SFRP1-wt) 和突变型 (SFRP1-mut) 片段, 并将其插入双荧光素酶报告载体 pmirGLO 中, 参照“1.2”中的转染方法, 将 SFRP1-wt 或 SFRP1-mut 质粒与 mimics-NC 或 miR-208a mimics 共转染至 293T 细胞中, 48 h 后按照双荧光素酶试剂盒说明书进行检测, 采用荧光酶标仪检测各组细胞双荧光素酶活性。以海肾荧光素酶为内参, 计算荧光素酶活性。荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性。

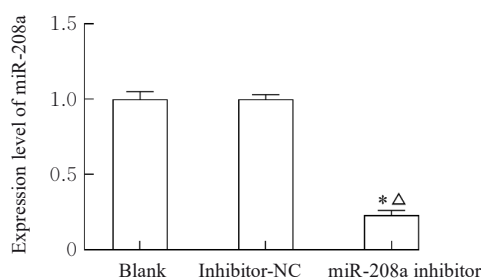
1.8 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件进行统计学分析。HT-29 细胞和 HT-29/5FU 细胞中 miR-208a 表达水平, 各组 HT-29/5FU 细胞增殖活性、IC₅₀ 值、凋亡率和双荧光素酶活性, 细胞中 SFRP1、 β -catenin、P-gp 和 ABCB1 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较

采用单因素方差分析, 两组间样本均数比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HT-29 细胞和 HT-29/5-FU 细胞中 miR-208a 表达水平 与 HT-29 细胞 (1.01 \pm 0.04) 比较, HT-29/5-FU 细胞中 miR-208a 表达水平 (5.35 \pm 0.43) 升高 ($P < 0.05$)。

2.2 下调 miR-208a 表达后各组细胞中 miR-208a 表达水平、细胞增殖活性、IC₅₀ 值和耐药指数 与空白组和 inhibitor-NC 组比较, miR-208a inhibitor 组细胞中 miR-208a 表达水平降低 ($P < 0.05$), 说明 miR-208a inhibitor 转染成功。见图 1。与空白组和 inhibitor-NC 组比较, 随着 5-FU 浓度升高, miR-208a inhibitor 组细胞增殖活性逐渐降低 ($P < 0.05$)。见图 2。与空白组 [(124.87 \pm 4.49) mg·L⁻¹] 和 inhibitor-NC 组 [(124.57 \pm 7.33) mg·L⁻¹] 比较, miR-208a inhibitor 组 HT-29/5-FU 细胞 IC₅₀ 值 [(23.84 \pm 1.72) mg·L⁻¹] 降低 ($P < 0.05$)。空白组和 inhibitor-NC 组 HT-29/5-FU 细胞耐药指数分别为 6.41 和 6.39, miR-208a inhibitor 组 HT-29/5-FU 细胞耐药指数为 1.22, 逆转倍数为 5.24。

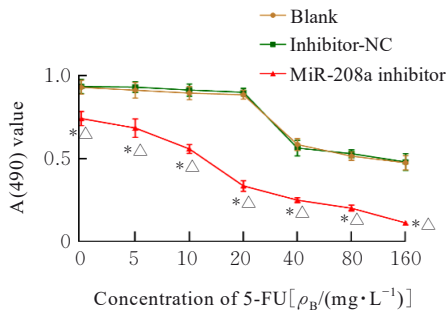


* $P < 0.05$ compared with blank group; $\Delta P < 0.05$ compared with inhibitor-NC group.

图 1 RT-qPCR 法检测各组细胞中 miR-208a 表达水平
Fig. 1 Expression levels of miR-208a in cells in various groups detected by RT-qPCR method

2.3 下调 miR-208a 表达后各组细胞凋亡率 与空白组和 inhibitor-NC 组比较, miR-208a inhibitor 组和 miR-208a inhibitor+5-FU 组细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), 5-FU 组和 inhibitor-NC+5-FU 组细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 miR-208a inhibitor 组比较, miR-208a inhibitor+5-FU 组细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$)。见图 3 和 4。

2.4 下调 miR-208a 表达后各组细胞中 β -catenin、P-gp 和 ABCB1 蛋白表达水平 与空白组和



* $P < 0.05$ compared with blank group; [△] $P < 0.05$ compared with inhibitor-NC group.

图2 MTT法检测不同浓度5-FU作用后各组细胞增殖活性

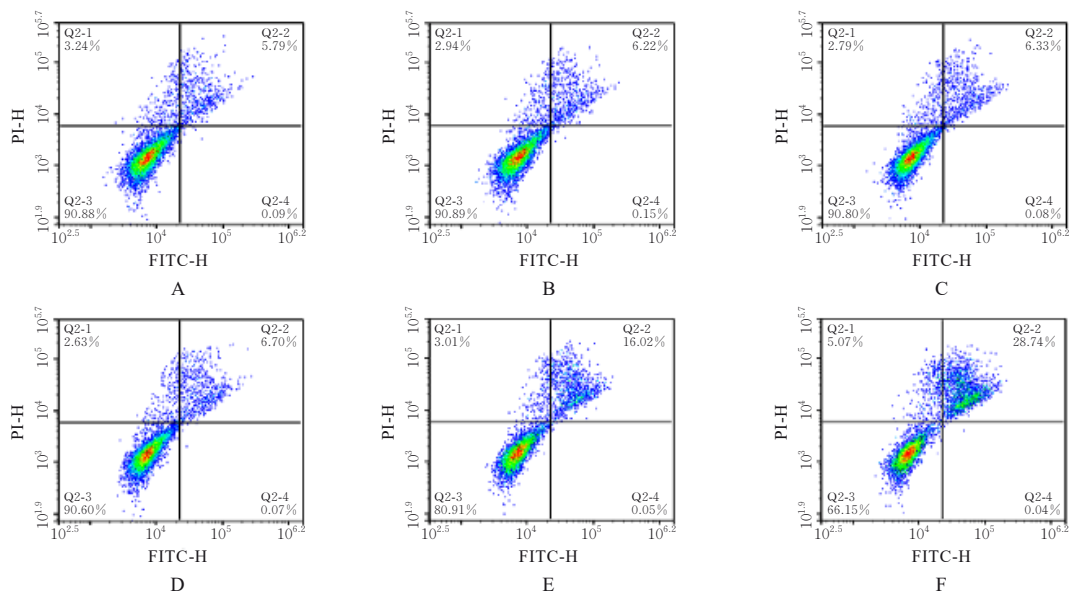
Fig. 2 Proliferation activities of cells in various groups after treated with different concentrations of 5-FU detected by MTT method

inhibitor-NC 组比较, miR-208a inhibitor 组细胞中 β -catenin、P-gp 和 ABCB1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。见图5。

2.5 miR-208a 与 SFRP1 的靶向关系 RT-qPCR 法结果显示: 与 HT-29 细胞 (0.99 ± 0.03) 比较, HT-29/5-FU 细胞中 SFRP1 mRNA 表达水平 (0.35 ± 0.05) 降低 ($P < 0.05$)。miRDB 在线数据库预测结果显示: SFRP1 序列中含有与 miR-208a 互补的结合位点。双荧光素酶报告基因实验结果显示: 与 SFRP1-wt+mimics NC 组比较, SFRP1-wt+

miR-208a mimics 组细胞荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$); 与 SFRP1-mut+mimics NC 组比较, SFRP1-mut+miR-208a mimics 组细胞荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Western blotting 法结果显示: 与空白组和 inhibitor-NC 组比较, miR-208a inhibitor 组细胞中 SFRP1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。提示 SFRP1 是 miR-208a 靶基因, 并且 miR-208a 可负向调控 SFRP1 的表达。见图6~8。

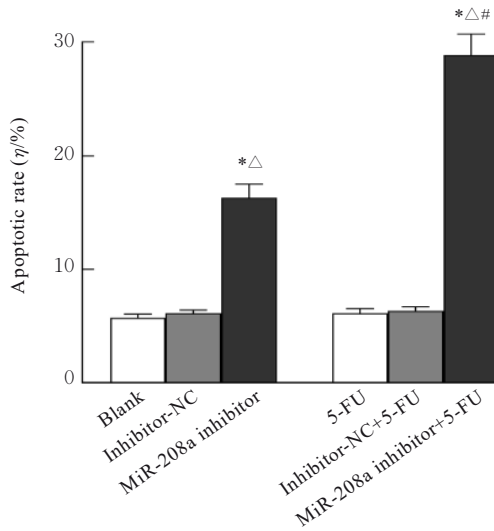
2.6 SFRP1 基因沉默和下调 miR-208a 表达后各组细胞中 SFRP1 蛋白表达水平、细胞增殖活性、IC₅₀ 和耐药指数 与 inhibitor-NC 组比较, miR-208a inhibitor 组细胞中 SFRP1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 miR-208a inhibitor 组和 miR-208a inhibitor+si-NC 组比较, miR-208a inhibitor+si-SFRP1 组细胞中 SFRP1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。见图9。与 inhibitor-NC 组比较, 随着 5-FU 浓度升高, miR-208a inhibitor 组和 miR-208a inhibitor+si-NC 组细胞增殖活性逐渐降低 ($P < 0.05$); 与 miR-208a inhibitor 组和 miR-208a inhibitor+si-NC 组比较, 随着 5-FU 浓度升高, miR-208a inhibitor+si-SFRP1 组细胞增殖活性升高 ($P < 0.05$)。见图10。与 inhibitor-NC 组 [$(120.67 \pm 6.58) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$] 比较, miR-208a inhibitor 组和 miR-208a inhibitor+si-NC 组细胞 IC₅₀ [$(23.52 \pm$



A: Blank group; B: Inhibitor-NC group; C: MiR-208a inhibitor group; D: 5-FU group; E: Inhibitor-NC+5-FU group; F: MiR-208a inhibitor+5-FU group.

图3 流式细胞术检测下调 miR-208a 表达后各组细胞凋亡率

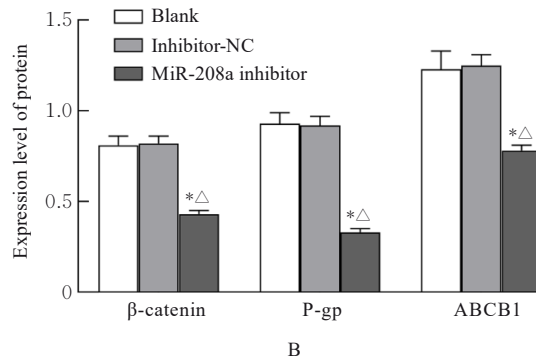
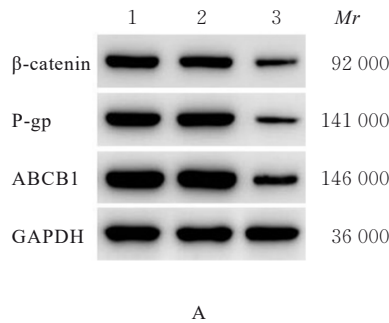
Fig. 3 Apoptotic rates of cells in various groups after downregulation of miR-208a expression detected by flow cytometry



* $P < 0.05$ compared with blank group; $\Delta P < 0.05$ compared with inhibitor-NC group; # $P < 0.05$ compared with miR-208a inhibitor group.

图4 下调miR-208a表达后各组细胞凋亡率

Fig. 4 Apoptotic rates of cells in various groups after downregulation of miR-208a expression



Lane 1: Blank group; Lane 2: Inhibitor-NC group; Lane 3: MiR-208a inhibitor group. * $P < 0.05$ compared with blank group; $\Delta P < 0.05$ compared with inhibitor-NC group.

图5 Western blotting法检测下调miR-208a表达后各组细胞中 β -catenin、P-gp和ABCB1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)
Fig. 5 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of β -catenin, P-gp, and ABCB1 proteins in cells in various groups after downregulation of miR-208a expression detected by Western blotting method

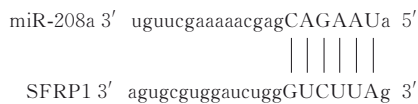


图6 SFRP1与miR-208a的结合位点

Fig. 6 Binding sites of SFRP1 and miR-208a

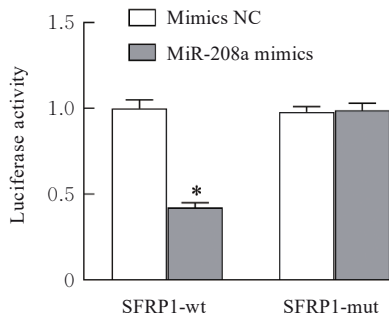
3 讨论

目前, 5-FU是临床治疗结直肠癌的主要化疗药物, 但其耐药性的产生会导致患者治疗效果不佳。肿瘤细胞可通过多种机制产生耐药性, 其中包

括 miRNA 转录调节。近年来研究^[9-10]显示: miRNA 不仅可以作为肿瘤预测和诊断的生物学指标, 而且与肿瘤发生发展和耐药性有密切关联。李新玲等^[11]研究表明: miR-208a 可能通过靶向调控蛋白酪氨酸磷酸酶受体 G (protein tyrosine phosphatase receptor type gamma, PTPRG) 来促进非小细胞肺癌 A549 细胞增殖、侵袭和迁移。YANG 等^[12]研究发现: miR-208a-3p 在人结直肠癌组织中高表达, 沉默其表达可抑制结直肠癌细胞增殖, 并诱导细胞凋亡。CUI 等^[13]研究显示:

1.32) 和 $(22.14 \pm 1.14) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 降低 ($P < 0.05$); 与 miR-208a inhibitor 组和 miR-208a inhibitor+si-NC 组比较, miR-208a inhibitor+si-SFRP1 组细胞 IC_{50} [$(111.73 \pm 2.91) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$] 升高 ($P < 0.05$)。与 inhibitor-NC 组 (耐药指数为 6.19) 比较, miR-208a inhibitor 组和 miR-208a inhibitor+si-NC 组细胞耐药指数 (1.21 和 1.14) 降低; 与 miR-208a inhibitor 组和 miR-208a inhibitor+si-NC 组比较, miR-208a inhibitor+si-SFRP1 组细胞耐药指数 (5.74) 升高, 逆转倍数为 5.05。

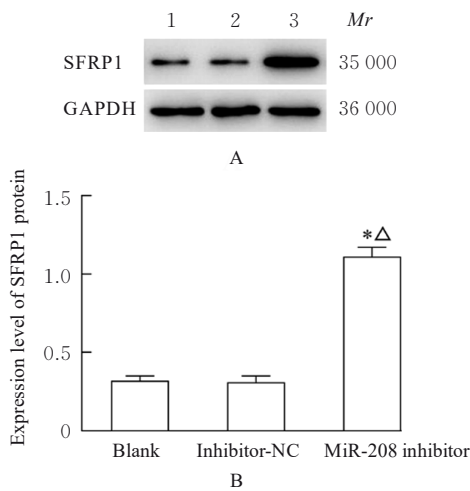
2.7 SFRP1 基因沉默和下调 miR-208a 表达后各组细胞中 β -catenin、P-gp 和 ABCB1 蛋白表达水平与 inhibitor-NC 组比较, miR-208a inhibitor 组细胞中 β -catenin、P-gp 和 ABCB1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与 miR-208a inhibitor 组和 miR-208a inhibitor+si-NC 组比较, miR-208a inhibitor+si-SFRP1 组细胞中 β -catenin、P-gp 和 ABCB1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。见图 11。



* $P < 0.05$ compared with SFRP1-wt+mimics NC group.

图7 各组细胞荧光素酶活性

Fig. 7 Luciferase activities in cells in various groups



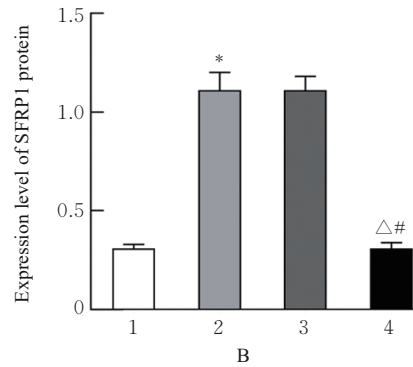
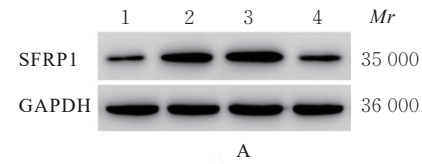
Lane 1: Blank group; Lane 2: Inhibitor NC group; Lane 3: MiR-208a inhibitor group. * $P < 0.05$ compared with blank group; $\Delta P < 0.05$ compared with inhibitor-NC group.

图8 Western blotting 法检测各组细胞中 SFRP1 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 8 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of SFRP1 protein in cells in various groups detected by Western blotting method

miR-208a 在胃癌组织中高表达, 可靶向负调控 SFRP1 进而促进胃癌细胞增殖和侵袭。但 miR-208a 是否参与结直肠癌 5-FU 耐药目前尚不明确。本研究结果证实: miR-208a 在结直肠癌 5-FU 耐药细胞株 HT-29/5-FU 细胞中高表达, 下调其表达可提高 SFRP1 蛋白表达水平, 降低 β -catenin、P-gp 和 ABCB1 蛋白表达水平, 抑制 HT-29/5-FU 细胞增殖活性, 促进细胞凋亡, 进而降低 HT-29/5-FU 细胞对 5-FU 的敏感性, 提示下调 miR-208a 可改善 HT-29/5-FU 细胞 5-FU 耐药。

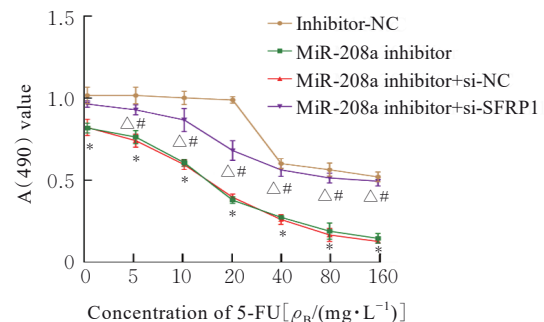
P-gp 是一种依赖 ATP 的外排转运蛋白, 是由 ABCB 基因编码的产物, 可以识别和促进肿瘤细胞



Lane 1: Inhibitor-NC group; Lane 2: MiR-208a inhibitor group; Lane 3: MiR-208a inhibitor+si-NC group; Lane 4: MiR-208a inhibitor+si-SFRP1 group. * $P < 0.05$ compared with inhibitor-NC group; $\Delta P < 0.05$ compared with miR-208a inhibitor group; # $P < 0.05$ compared with miR-208a inhibitor+si-NC group.

图9 Western blotting 法检测 SFRP1 基因沉默和下调 miR-208a 表达后各组细胞中 SFRP1 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

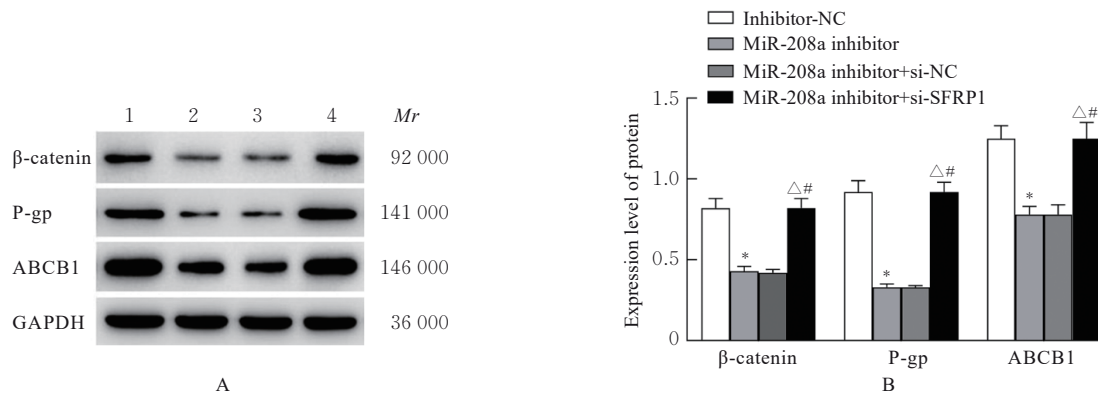
Fig. 9 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of SFRP1 protein in cells in various groups after SFRP1 gene silencing and downregulation of miR-208a expression detected by Western blotting method



* $P < 0.05$ compared with inhibitor-NC group; $\Delta P < 0.05$ compared with miR-208a inhibitor group; # $P < 0.05$ compared with miR-208a inhibitor+si-NC group.

图10 MTT 法检测 SFRP1 基因沉默和下调 miR-208a 表达后各组细胞增殖活性

Fig. 10 Proliferation activities of cells in various groups after SFRP1 gene silencing and downregulation of miR-208a expression detected by MTT method



Lane 1: Inhibitor-NC group; Lane 2: MiR-208a inhibitor group; Lane 3: MiR-208a inhibitor+si-NC group; Lane 4: MiR-208a inhibitor+si-SFRP1 group. * P <0.05 compared with inhibitor-NC group; Δ P <0.05 compared with miR-208a inhibitor group; # P <0.05 compared with miR-208a inhibitor-si-NC group.

图 11 Western blotting 法检测 SFRP1 基因沉默和下调 miR-208a 表达后各组细胞中 β -catenin、P-gp 和 ABCB1 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 11 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of β -catenin, P-gp, and ABCB1 proteins in cells in various groups after SFRP1 gene silencing and downregulation of miR-208a expression detected by Western blotting method

的药物外排,降低药物疗效,其高表达是多种肿瘤耐药细胞对化疗药敏感性降低的原因之一^[14-16],降低细胞中P-gp的表达是提高结直肠癌耐药细胞对化疗药物敏感性的重要途径。Wnt信号通路是一类在物种进化过程中高度保守的信号通路,对细胞增殖、迁移和分化有重要影响, β -catenin是Wnt信号通路中的关键调控因子^[17-18]。SFRP1是Wnt信号通路拮抗剂,是近年来发现的新的抑癌基因。SFRP1基因在多种肿瘤中的缺失导致Wnt信号通路转导途径紊乱,影响肿瘤的发生发展^[19]。沈二栋等^[20]研究发现:SFRP1在胃癌组织中低表达,上调其表达水平可阻断Wnt通路,进而抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭。HU等^[21]研究表明:miR-1180可通过靶向负调控SFRP1激活Wnt通路进而促进卵巢癌细胞增殖。WANG等^[22]研究显示:SFRP1在人结直肠癌组织中低表达,而过表达SFRP1可明显抑制结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭,诱导细胞凋亡,并下调Wnt和 β -catenin蛋白表达水平,提示SFRP1在结直肠癌恶性进程中扮演抑制基因的角色。本研究结果显示:与HT-29细胞比较,SFRP1在HT-29/5-FU细胞中低表达;生物信息学分析和双荧光素酶报告基因实验提示:SFRP1是miR-208a潜在的下游靶基因;抑制miR-208a表达后,SFRP1表达水平升高,说明miR-208a可靶向下调SFRP1表达。本研究结果显示:下调miR-208a和沉默SFRP1基因共同处理后,HT-29/5-FU细胞增殖活性升高,对5-FU耐受性增强,细胞中

β -catenin、P-gp和ABCB1蛋白表达水平升高,提示沉默SFRP1基因可逆转下调miR-208a对HT-29/5-FU细胞5-FU耐药,表明下调miR-208a可改善HT-29/5-FU细胞5-FU耐药,其分子机制可能与靶向SFRP1介导的Wnt通路有关。

综上所述,miR-208a在结直肠癌耐药株HT-29/5-FU细胞中高表达,下调其表达可能通过靶向上调SFRP1抑制Wnt信号通路降低癌细胞对5-FU的耐药性。miR-208a可能成为人结直肠癌5-FU耐药治疗的潜在分子靶点和生物标志物。本研究不足之处在于实验结果均由体外实验研究得出,后续将通过动物体内实验进一步验证。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

胡兵兵和罗康宁参与研究设计、实验操作过程和论文撰写,彭肃和周煜中参与实验操作过程,陈茂良参与统计学分析,刘昌化参与论文审校。

[参考文献]

- [1] ISLAM M R, AKASH S, RAHMAN M M, et al. Colon cancer and colorectal cancer: prevention and treatment by potential natural products [J]. Chem Biol Interact, 2022, 368: 110170.
- [2] PATY P B, GARCIA-AGUILAR J. Colorectal cancer [J]. J Surg Oncol, 2022, 126(5): 881-887.
- [3] BLONDY S, DAVID V, VERDIER M, et al.

- 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: from classical pathways to promising processes [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(9): 3142-3154.
- [4] ZOU Y T, ZHENG S Q, XIAO W K, et al. circRAD18 sponges miR-208a/3164 to promote triple-negative breast cancer progression through regulating IGF1 and FGF2 expression [J]. *Carcinogenesis*, 2019, 40(12): 1469-1479.
- [5] LIU L, WANG W Z, GAO S, et al. MicroRNA-208a directly targets Src kinase signaling inhibitor 1 to facilitate cell proliferation and invasion in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3140-3148.
- [6] QIN F, TANG H Y, ZHANG Y, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-208a promotes osteosarcoma cell proliferation, migration, and invasion [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(5): 4734-4745.
- [7] 王晓凤, 田勇, 柳艳飞, 等. SFRP1/FZD6抑制Wnt/ β -catenin信号通路对A549肺癌细胞生物学行为的影响 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(33): 14-16, 20.
- [8] 罗康宁, 刘昌化. 山楂酸通过调控DNA损伤修复逆转结肠癌HT-29细胞5-氟尿嘧啶耐药 [J]. *中药材*, 2021, 44(10): 2430-2434.
- [9] 刘久莲, 刘童, 高善语. MicroRNA在结直肠癌耐药及治疗中作用的研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(5): 438-444.
- [10] SHAW P, LOKHOTIYA K, KUMARASAMY C, et al. Mapping research on miRNAs in cancer: a global data analysis and bibliometric profiling analysis [J]. *Pathophysiology*, 2022, 29(1): 66-80.
- [11] 李新玲, 吴振国, 张立海, 等. MiR-208a促进非小细胞肺癌A549细胞增殖、侵袭和迁移的功能和机制研究 [J]. *天津医药*, 2021, 49(3): 242-247, 338.
- [12] YANG B L, LIU G Q, LI P, et al. Circular RNA CUL2 regulates the development of colorectal cancer by modulating apoptosis and autophagy via miR-208a-3p/PPP6C [J]. *Aging*, 2022, 14(1): 497-508.
- [13] CUI H B, GE H E, WANG Y S, et al. MiR-208a enhances cell proliferation and invasion of gastric cancer by targeting SFRP1 and negatively regulating MEG3 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 102: 31-39.
- [14] ZHANG H, XU H W, ASHBY C R Jr, et al. Chemical molecular-based approach to overcome multidrug resistance in cancer by targeting P-glycoprotein (P-gp) [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(1): 525-555.
- [15] JIANG L, ZHANG Y, GUO L H, et al. Exosomal microRNA-107 reverses chemotherapeutic drug resistance of gastric cancer cells through HMGA2/mTOR/P-gp pathway [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 1290.
- [16] AIRES V, COLIN D J, DOREAU A, et al. P-glycoprotein 1 affects chemoactivities of resveratrol against human colorectal cancer cells [J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 2098.
- [17] 霍迪妮, 聂小博. 经典Wnt信号通路与肿瘤免疫耐受的研究进展 [J]. *医学综述*, 2022, 28(14): 2808-2813.
- [18] 田宇佳, 魏铭, 赵辉. Wnt/ β -catenin信号通路在肿瘤干细胞中的作用研究进展 [J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(8): 831-837.
- [19] 伍丹, 伍尤华. Wnt拮抗因子SFRP1与肿瘤相关性的研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2015, 31(7): 1016-1019.
- [20] 沈二栋, 翁洁, 文芳, 等. miRNA-31靶向SFRP1介导Wnt/ β -catenin信号通路对人胃癌细胞生物学特性的调控作用 [J]. *肿瘤药学*, 2019, 9(4): 578-585.
- [21] HU J H, ZHAO W, HUANG Y J, et al. MiR-1180 from bone marrow MSCs promotes cell proliferation and glycolysis in ovarian cancer cells via SFRP1/Wnt pathway [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 66.
- [22] WANG Z C, LI R J, HE Y S, et al. Effects of secreted frizzled-related protein 1 on proliferation, migration, invasion, and apoptosis of colorectal cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 48.