

[文章编号] 1671-587X(2025)05-1185-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250504

miR-325-3p 靶向 PRELID1 基因介导 EMT 通路对结肠癌细胞侵袭和迁移的影响及其机制

朱平胜, 葛思堂, 左芦根, 陈德利, 张洋洋

(蚌埠医科大学第一附属医院胃肠外科, 安徽 蚌埠 233000)

[摘要] **目的:** 探讨微小RNA-325-3p (*miR-325-3p*) 过表达对结肠癌细胞侵袭和迁移的影响, 阐明其作用机制。**方法:** 收集25例明确诊断为结肠癌患者的肿瘤组织及对应的癌旁正常组织。采用实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 法检测癌旁正常组织和结肠癌组织中 *miR-325-3p* 和进化及淋巴兴趣相关结构域蛋白1 (*PRELID1*) mRNA 表达水平。采用 RT-qPCR 法和 Western blotting 法检测人正常结肠细胞 NCM460 及结肠癌细胞 SW480、HCT116 和 HT-29 中 *miR-325-3p* 及 *PRELID1* mRNA 表达水平和 *PRELID1* 蛋白表达水平。将 SW480 细胞分为对照组、NC-mimics 组、*miR-325-3p* mimics 组、*miR-325-3p* mimics+oe-NC 组和 *miR-325-3p* mimics+oe-*PRELID1* 组。采用 Transwell 小室实验和细胞划痕实验分别检测各组细胞侵袭及迁移能力, Western blotting 法检测各组细胞中上皮-间质转化 (EMT) 中 E-钙黏蛋白 (E-Cadherin)、N-钙黏蛋白 (N-Cadherin) 和波形蛋白 (Vimentin) 表达水平。使用 Targetscan 生物信息学网站预测 *miR-325-3p* 下游靶基因, 采用双荧光素酶实验验证 *miR-325-3p* 与 *PRELID1* 的靶向调控关系。**结果:** 与癌旁正常组织比较, 结肠癌组织中 *miR-325-3p* 表达水平明显降低 ($P<0.05$), *PRELID1* mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.05$), 且结肠癌组织中 *miR-325-3p* 和 *PRELID1* mRNA 表达水平呈负相关关系 ($r<0$, $R^2=0.392$, $P<0.001$)。与 NCM460 细胞比较, SW480、HCT116 和 HT-29 细胞中 *miR-325-3p* 表达水平均明显降低 ($P<0.05$), *PRELID1* mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.05$)。与对照组和 NC-mimics 组比较, *miR-325-3p* mimics 组 SW480 细胞侵袭细胞数明显减少 ($P<0.05$), 划痕愈合率降低 ($P<0.05$), E-Cadherin 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$), N-Cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。双荧光素酶实验证实 *PRELID1* 是 *miR-325-3p* 的直接靶标。与 *miR-325-3p* mimics+oe-NC 组比较, *miR-325-3p* mimics+oe-*PRELID1* 组 SW480 细胞侵袭细胞数明显增加 ($P<0.05$), 划痕愈合率升高 ($P<0.05$), E-Cadherin 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$), N-Cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平均升高 ($P<0.05$)。**结论:** 过表达 *miR-325-3p* 可靶向下调 *PRELID1* 表达, 抑制 EMT 进程, 进而抑制 SW480 细胞侵袭和迁移。

[关键词] 微小RNA-325-3p; 进化及淋巴兴趣相关结构域蛋白1; 结肠肿瘤; 细胞侵袭; 细胞迁移; 上皮-间质转化

[中图分类号] R735.35 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-11-11 **[录用日期]** 2024-12-19

[基金项目] 安徽省卫健委卫生健康科研项目 (AHWJ2022a019); 蚌埠医科大学自然科学基金项目 (2023byzd095)

[作者简介] 朱平胜 (1991-), 男, 安徽省蚌埠市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事消化系统常见肿瘤诊治方面的研究。

[通信作者] 张洋洋, 主治医师 (E-mail: zhangyangyang@hrbmu.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Effect of *miR-325-3p* targeting *PRELID1* gene in regulation of EMT pathway on invasion and migration of colon cancer cells and their mechanisms

ZHU Pingsheng, GE Sitang, ZUO Lugen, CHEN Deli, ZHANG Yangyang

(Department of Gastrointestinal Surgery, First Affiliated Hospital, Bengbu Medical University, Bengbu 233000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of microRNA-325-3p (*miR-325-3p*) over-expression on the invasion and migration of colon cancer cells, and to clarify their mechanisms. **Methods:** The tumor tissue and the corresponding adjacent normal tissue of 25 patients clearly diagnosed with colon cancer were collected. The expression levels of *miR-325-3p* and relevant evolutionary and lymphoid interest domain containing protein 1 (*PRELID1*) mRNA were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method. The expression levels of *miR-325-3p* and *PRELID1* mRNA and the expression levels of *PRELID1* protein in human normal colon cells NCM460 and colon cancer cells SW480, HCT116 and HT-29 were detected by RT-qPCR and Western blotting methods. The SW480 cells were divided into control group, NC-mimics group, *miR-325-3p* mimics group, *miR-325-3p* mimics+oe-NC group and *miR-325-3p* mimics+oe-*PRELID1* group. The invasion and migration abilities of cells in various groups were detected by Transwell chamber assay and scratch healing assay, respectively. The expression levels of E-Cadherin, N-Cadherin and Vimentin in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cells in various groups were detected by Western blotting method. The downstream target genes of *miR-325-3p* were predicted using the Targetscan bioinformatics website, and the targeted regulatory relationship between *miR-325-3p* and *PRELID1* was verified by the dual-luciferase assay. **Results:** Compared with adjacent normal tissue, the expression level of *miR-325-3p* in cancer tissue was significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression level of *PRELID1* mRNA was significantly increased ($P < 0.05$). The expression levels of *miR-325-3p* and *PRELID1* mRNA was negatively correlated in colon cancer tissue ($r < 0$, $R^2 = 0.392$, $P < 0.001$). Compared with NCM460 cells, the expression levels of *miR-325-3p* in SW480, HCT116 and HT-29 cells were significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression levels of *PRELID1* mRNA were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with control group and NC-mimics group, the number of invasive SW480 cells in *miR-325-3p* mimics group was significantly reduced ($P < 0.05$), the rate of scratch healing was decreased ($P < 0.05$), and the expression level of E-Cadherin protein was increased, while the expression levels of N-Cadherin and Vimentin proteins were decreased ($P < 0.05$). The dual-luciferase assay confirmed that *PRELID1* was the direct target of *miR-325-3p*. Compared with *miR-325-3p* mimics+oe-NC group, the number of invasive SW480 cells in *miR-325-3p* mimics+oe-*PRELID1* group was significantly increased ($P < 0.05$), the rate of scratch healing was increased ($P < 0.05$), the expression level of E-Cadherin protein was decreased, and the expression levels of N-Cadherin and Vimentin proteins were increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Over-expression of *miR-325-3p* can inhibit EMT process by down-regulating *PRELID1* expression, thereby inhibiting SW480 cell invasion and migration.

KEYWORDS MicroRNA-325-3p; Relevant evolutionary and lymphoid interest domain containing protein 1; Colon neoplasm; Cell invasion; Cell migration; Epithelial-mesenchymal transition

结肠癌是世界范围内最常见的癌症之一，2020年结肠癌新发患者近120万，相关死亡病例近60万^[1]。结直肠癌局部病变患者5年生存率可达90%，然而伴有远处转移的结肠癌患者生存率降至

14%^[2]。微小RNA (microRNAs, miRNAs) 是一种与真核生物生长和病理进程相关的非编码RNA^[3], 其在多种癌症中呈现异常表达, 并直接调控肿瘤发生和侵袭转移等恶性生物学行为^[4]。研究^[5-7]显示: *miR-325-3p* 在肺癌、胃癌和膀胱癌等多种实体肿瘤中表达异常。进化和淋巴兴趣相关结构域蛋白1 (relevant evolutionary and lymphoid interest domain containing protein 1, *PRELID1*) 作为PRELI样蛋白家族核心成员, 近年被证实是肿瘤进展的关键调控枢纽。研究^[8]显示: *PRELID1* 是肿瘤发展的一个重要开关, 其通过依赖细胞微环境的方式, 精准调节线粒体活性氧生成和细胞增殖。XU等^[9]研究发现: *PRELID1* 在肝癌组织中呈现特异性高表达, 且*PRELID1* 可作为肝癌患者的独立预测生物标志物。本课题组前期通过生物信息学分析发现 *miR-325-3p* 与 *PRELID1* 基因间存在结合位点, 然而目前尚未有文献阐明 *miR-325-3p* 靶向 *PRELID1* 在结肠癌中的调控作用。基于此, 本研究探讨 *miR-325-3p* 和 *PRELID1* 对人结肠癌细胞 SW480 侵袭、迁移及上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 通路的影响, 阐明其相关分子机制, 为结肠癌靶向治疗提供潜在分子靶点和理论依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集2024年1—6月于蚌埠医科大学第一附属医院行结肠癌根治术患者25例, 于术中采集结肠癌及癌旁正常组织 (距癌结缘 ≥ 3 cm)。所有患者均签订知情同意书。纳入标准: ①手术前后均有确切病理诊断, 确认为结肠癌; ②术前未接受过任何治疗。排除标准: ①非原发肿瘤或并发其他肿瘤; ②患有心、肝和肾等重要脏器严重功能障碍; ③重症感染者。本研究获得蚌埠医科大学第一附属医院伦理委员会批准 (伦科批字 [2024] 第213号)。

1.2 细胞、主要试剂和仪器 人正常结肠细胞 NCM460 及结肠癌细胞 SW480、HCT116 和 HT-29 购自武汉尚恩生物公司, RPMI-1640、DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司; SYBR Green 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, cDNA 反转录试剂盒、Lipo6000TM 转染试剂盒、荧光素酶报告基因检测试剂盒和 Matrigel 基质胶购自上海碧云天科技有限公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, TRIzol 试剂购自美国 Thermo Fisher 科技公司;

兔抗人 *PRELID1* 抗体、兔抗人 E-钙黏蛋白 (E-Cadherin) 抗体、兔抗人 N-钙黏蛋白 (N-Cadherin) 抗体、兔抗人波形蛋白 (Vimentin) 抗体、兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体和山羊抗兔 IgG 二抗均购自武汉三鹰科技有限公司, 引物、*miR-325-3p* mimics 片段、oe-*PRELID1* 质粒、*PRELID1* 野生型 (WT-*PRELID1*) 片段 (GCACTGGC) 和 *PRELID1* 突变型 (MUT-*PRELID1*) 片段 (CACGAAAA) 均购自上海吉凯基因公司。实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪 (型号: Mx3000P) 购自美国 Agilent 公司, CO₂ 培养箱 (型号: BB15) 和低温冷冻高速离心机 (型号: Freso 21) 购自美国 Thermo Fisher 公司, 普通倒置显微镜 (型号: CKX41) 购于日本 Olympus 公司, 电泳仪 (型号: PowerPac basic) 购自美国 Bio-Rad 公司, 多功能酶标仪 (型号: Infinite M200 Pro) 购自瑞士 Tecan 公司。

1.3 细胞培养、转染和分组 配置含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素的培养基, 将细胞于 37 °C 含 5% CO₂ 培养箱中进行培养。细胞分为对照组 (未处理)、NC-mimics 组 (转染质粒空载体)、*miR-325-3p* mimics 组 (转染 *miR-325-3p* 模拟物)、*miR-325-3p* mimics+oe-NC 组 (同时转染 *miR-325-3p* 模拟物和质粒空载体) 和 *miR-325-3p* mimics+oe-*PRELID1* 组 (同时转染 *miR-325-3p* 模拟物和 *PRELID1* 过表达质粒)。采用 Lipo6000TM 转染试剂盒按对应方法对各组细胞进行转染, 48 h 后收集细胞进行后续实验。

1.4 RT-qPCR 法检测各组组织和细胞中 *miR-325-3p* 和 *PRELID1* mRNA 表达水平 收集患者结肠癌及癌旁组织, NCM460、SW480、HCT116 和 HT-29 细胞及处理后的各组 SW480 细胞, 使用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 通过逆转录试剂盒将 RNA 反转录合成 cDNA。依据 SYBR Green 试剂盒说明, 加入引物和 cDNA 配置反应体系, 进行 RT-qPCR 扩增。引物序列: *miR-325-3p*, 上游引物 5'-GTAGGTGT-CCAGTAAGTG-3', 下游引物 5'-GAACATGTCT-GCGTATCTC-3'; *PRELID1*, 上游引物 5'-GCAG-CTGAAAGA-AGCCCAAG-3', 下游引物 5'-AGC-CTGAATGCCTTCCTCAG-3'; *GAPDH*, 上游引物 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGTATTG-3',

下游引物 5'-CCTGGAAGATGGTGATGGGATT-3'。反应条件:变性 95 °C、20 s,退火 55 °C、40 s,延伸 72 °C、35 s,共 35 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组组织和细胞中 *miR-325-3p* 和 *PRELID1* mRNA 表达水平。

1.5 Western blotting 法检测各组细胞中 PRELID1、E-Cadherin、N-Cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平 取 NCM460、SW480、HCT116 和 HT-29 细胞及处理后各组 SW480 细胞,加入 Ripa 裂解液提取细胞总蛋白,分别经过浓度测定、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)及 PVDF 转膜后,使用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。PRELID1、E-Cadherin、N-Cadherin 和 Vimentin 一抗均以 1:1 000 稀释比例于 4 °C 孵育过夜。经含吐温的 Tris 缓冲盐溶液(Tris-buffered saline with Tween, TBST)清洗后,加入 IgG 二抗(稀释比 1:5 000)室温孵育 2 h。加入 ECL 显影液曝光显影。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,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/内参蛋白(GAPDH)条带灰度值。

1.6 Transwell 小室实验检测各组侵袭细胞数 将 Matrigel 基质胶均匀铺于 Transwell 小室底部。各组 SW480 细胞经胰蛋白酶消化后,使用无血清培养基重悬细胞密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,取 100 μL 培养基于上室,600 μL 完全培养基于下室。培养箱培养 24 h,加入多聚甲醛固定,结晶紫溶液染色,使用显微镜观察并随机选取 3 个视野,计算视野内穿膜细胞数,取 3 个视野穿膜细胞数平均值为各组侵袭细胞数。

1.7 细胞划痕实验检测各组划痕愈合率 取各组转染后细胞,经胰蛋白酶消化后,重悬细胞密度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,取 1 mL 接种于 6 孔细胞培养板,细胞培养至融合度达 90% 后,通过无菌枪头在板中央作一划痕,继续培养细胞 24 h。分别于 0 h 和 24 h 使用倒置显微镜拍照。划痕愈合率=(0 h 划痕宽度-24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.8 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-325-3p 与 PRELID1 基因的靶向关系 构建基因质粒野生型 WT-*PRELID1* 片段和突变型 MUT-*PRELID1* 片段,采用 Lipo6000™ 转染试剂将 WT-*PRELID1* 和 MUT-*PRELID1* 基因质粒分别与 NC-mimics 或 miR-325-3p mimics 共转染至 SW480 细胞。转染后培养箱孵

育 24 h,采用酶标仪检测各组细胞荧光素酶活性。细胞荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶荧光强度/海肾荧光素酶荧光强度。比较各组细胞荧光素酶活性,验证 *miR-325-3p* 与 *PRELID1* 基因的靶向关系。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行统计学分析。正常组织、结肠癌组织和各组细胞中 *miR-325-3p* 及 *PRELID1* mRNA 表达水平、各组侵袭细胞数、划痕愈合率及细胞中 PRELID1、E-Cadherin、N-Cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间样本均数比较采用两独立样本 *t* 检验,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用 SNK-*q* 检验。采用 Pearson 法分析 *miR-325-3p* 与 *PRELID1* mRNA 表达水平的相关性。每组实验重复 3 次。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

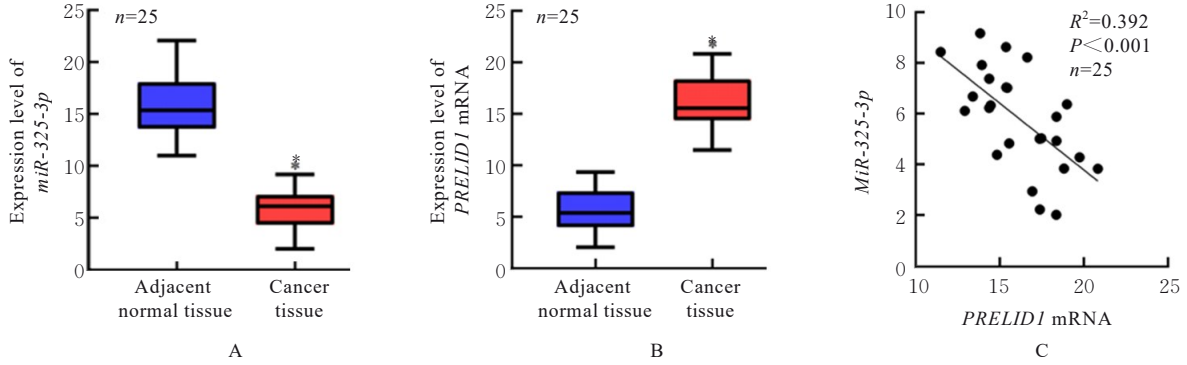
2.1 正常组织和结肠癌组织中 miR-325-3p 及 PRELID1 mRNA 表达水平 与癌旁正常组织比较,结肠癌组织中 *miR-325-3p* 表达水平明显降低 ($P < 0.05$), *PRELID1* mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。Pearson 法分析结果显示:*miR-325-3p* 与 *PRELID1* mRNA 表达水平在结肠癌中呈负相关关系 ($r < 0$, $R^2 = 0.392$, $P < 0.001$)。见图 1。

2.2 正常结肠细胞和结肠癌细胞中 miR-325-3p 及 PRELID1 mRNA 表达水平和 PRELID1 蛋白表达水平 与人正常结肠细胞 NCM460 比较,结肠癌细胞 SW480、HCT116 和 HT-29 中 *miR-325-3p* 表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), *PRELID1* mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图 2A。Western blotting 法检测结果显示:与人正常结肠细胞 NCM460 比较,结肠癌细胞 SW480、HCT116 和 HT-29 中 PRELID1 蛋白表达量明显升高。见图 2B。因 SW480 细胞中 *miR-325-3p* 表达最低,所以本研究选择 SW480 细胞进行后续过表达 *miR-325-3p* 实验。

各组细胞处理后,对照组 (3.32 ± 0.49) 与 NC-mimics 组 (3.54 ± 0.40) *miR-325-3p* 表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组比较,miR-325-3p mimics 组细胞中 *miR-325-3p* 表达水平 (13.47 ± 0.13) 明显升高 ($P < 0.05$),证明 miR-325-3p 模拟物转染成功。

2.3 各组 SW480 细胞侵袭细胞数和划痕愈合率 对照组和 NC-mimics 组侵袭细胞数和划痕愈合率

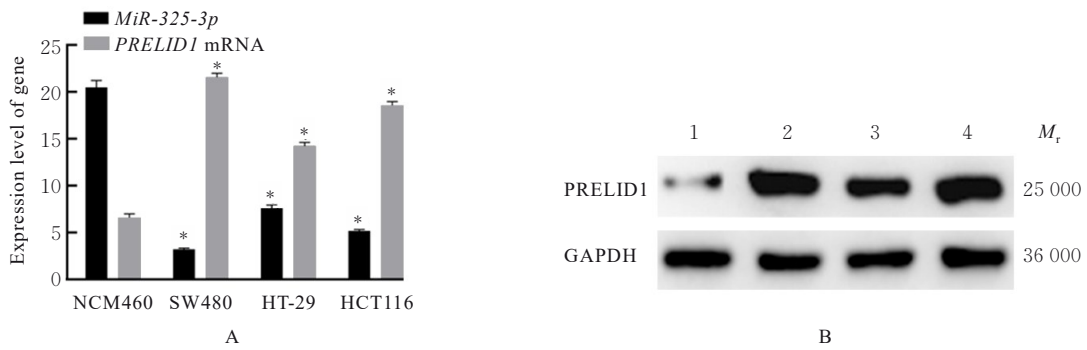
比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组和 NC-mimics 组比较, *miR-325-3p* mimics 组侵袭细胞数减少 ($P < 0.05$), 划痕愈合率降低 ($P < 0.05$)。见图 3、图 4 和表 1。



* $P < 0.05$ vs adjacent normal tissue.

图 1 癌旁正常组织与肿瘤组织中 *miR-325-3p*(A)和 *PRELID1* mRNA(B)表达水平及二者相关性(C)

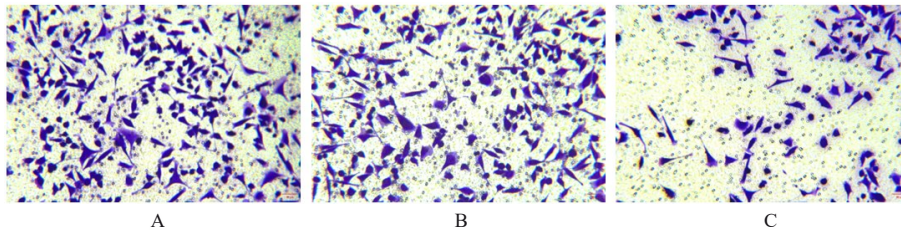
Fig. 1 Expression levels of *miR-325-3p*(A) and *PRELID1* mRNA(B) in adjacent normal tissue and colon cancer tissue and their correlations(C)



A: Expression levels of *miR-325-3p* and *PRELID1* mRNA in various cells; B: Electrophoregram of expression of *PRELID1* protein in various cells(Lane 1: NCM460 cells; Lane 2: SW480 cells; Lane 3: HT-29 cells; Lane 4: HCT116 cells). * $P < 0.05$ vs NCM460 cells.

图 2 正常结肠细胞和结肠癌细胞中 *miR-325-3p* 及 *PRELID1* mRNA 表达水平和 *PRELID1* 蛋白表达情况

Fig. 2 Expression levels of *miR-325-3p* and *PRELID1* mRNA and expressions of *PRELID1* protein in normal colon and colon cancer cells



A: Control group; B: NC-mimics group; C: MiR-325-3p mimics group.

图 3 各组 SW480 细胞侵袭情况(结晶紫, $\times 400$)

Fig. 3 Invasion of SW480 cells in various groups(Crystal violet, $\times 400$)

2.4 各组 SW480 细胞中 EMT 相关蛋白表达水平 与对照组和 NC-mimics 组比较, *miR-325-3p* mimics 组 SW480 细胞中 E-Cadherin 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), N-Cadherin 和 Vimentin 蛋

白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.5 双荧光素酶实验验证 *miR-325-3p* 与 *PRELID1* 基因的靶向调控关系 Targetscan 网站预测 *miR-325-3p* 与 *PRELID1* 基因间存在结合位点。

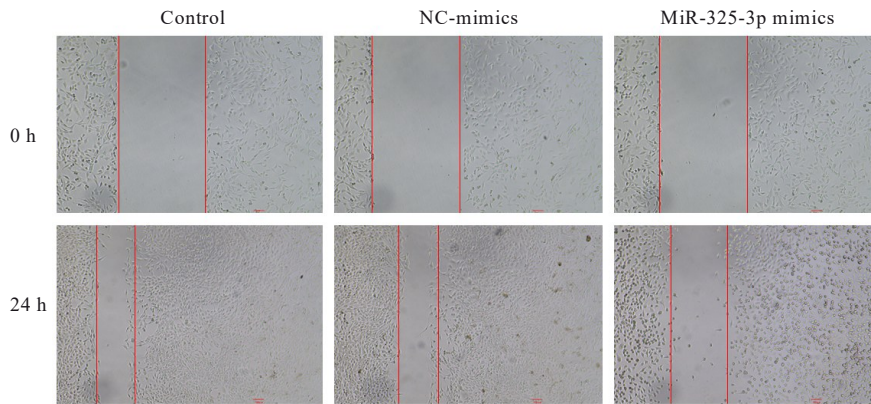
图4 各组SW480细胞迁移情况($\times 200$)Fig. 4 Migration of SW480 cells in various groups($\times 200$)

表1 各组SW480细胞侵袭细胞数和划痕愈合率

Tab. 1 Numbers of invasion SW480 cells and rates of scratch healing in various groups ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Group	Number of invasion cells	Rate of scratch healing ($\eta/\%$)
Control	213.33 \pm 7.51	76.38 \pm 4.65
NC-mimics	212.33 \pm 4.16	74.51 \pm 5.36
MiR-325-3p mimics	69.00 \pm 3.61 ^{*Δ}	20.99 \pm 2.35 ^{*Δ}

* $P<0.05$ vs control group; $\Delta P<0.05$ vs NC-mimics group.

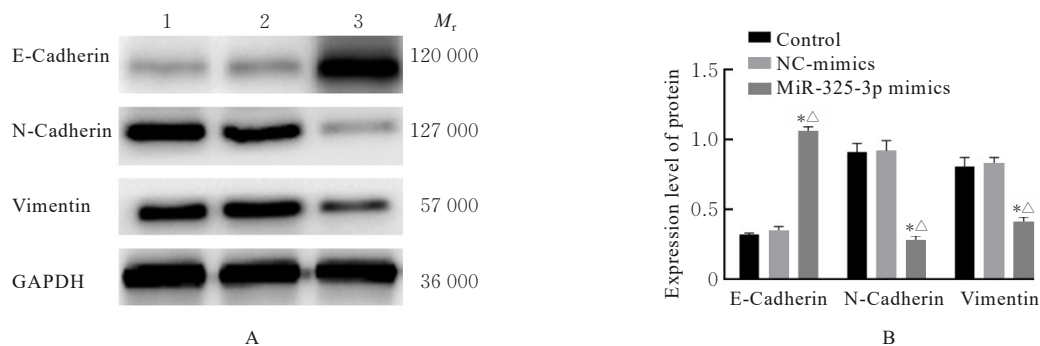
双荧光素酶实验结果显示:共转染WT-*PRELID1*质粒后,与NC-mimics组比较,miR-325-3p mimics组细胞荧光素酶活性明显降低($P<0.05$);共转染MUT-*PRELID1*质粒后,NC-mimics组和miR-325-3p mimics组细胞荧光素酶活性比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图6。

2.6 转染后各组细胞中PRELID1蛋白表达水平

Western blotting法检测结果显示:对照组和NC-mimics组细胞中PRELID1蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组和NC-mimics组比较,miR-325-3p mimics组细胞中PRELID1蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。见图7。

2.7 miR-325-3p和PRELID1共转染后2组侵袭细胞数和划痕愈合率

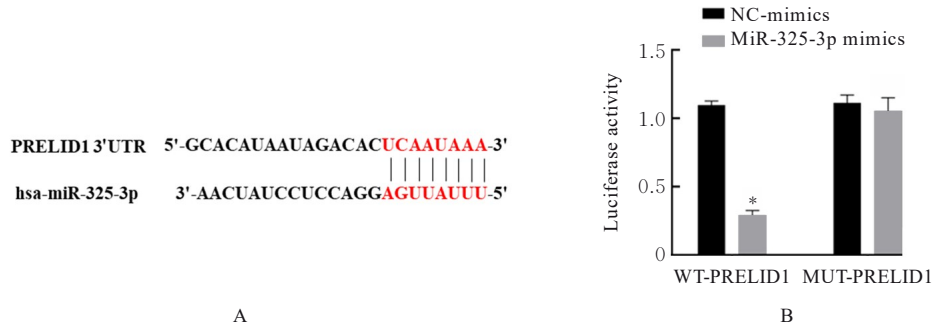
与miR-325-3p mimics+oe-NC组(0.82 \pm 0.04)比较,miR-325-3p mimics+oe-*PRELID1*组细胞中*PRELID1* mRNA表达水平(3.29 \pm 0.04)明显升高($P<0.05$),证明转染片段有效。与miR-325-3p mimics+oe-NC组(60.33 \pm 5.86和22.00% \pm 3.61%)比较,miR-325-3p mimics+oe-*PRELID1*组侵袭细胞数(195.00 \pm 10.15)明显增加($P<0.05$),划痕愈合率(65.33% \pm 3.51%)明显升高($P<0.05$)。见图8和9。



Lane 1: Control group; Lane 2: NC-mimics group; Lane 3: MiR-325-3p mimics group. * $P<0.05$ vs control group; $\Delta P<0.05$ vs NC-mimics group.

图5 各组SW480细胞中EMT信号通路相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

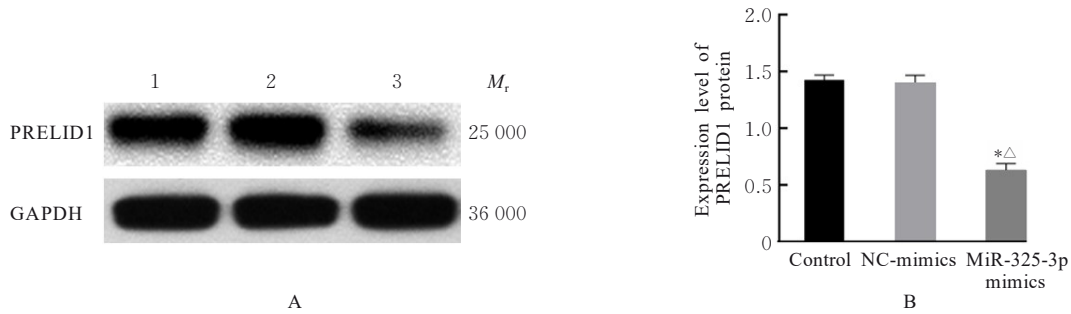
Fig. 5 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of EMT signaling pathway-related proteins in SW480 cells in various groups



* $P < 0.05$ vs NC-mimics group.

图6 miR-325-3p 与 PRELID1 结合位点(A)和各组 SW480 细胞荧光素酶活性(B)

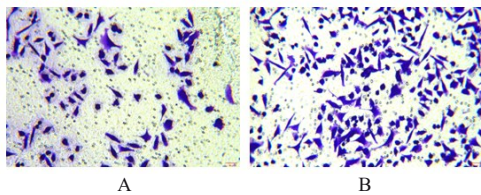
Fig. 6 Binding site of miR-325-3p and PRELID1(A) and luciferase activities in SW480 cells in various groups(B)



Lane 1: Control group; Lane 2: NC-mimics group; Lane 3: MiR-325-3p mimics group. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs NC-mimics group.

图7 各组 SW480 细胞中 PRELID1 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 7 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expression of PRELID1 protein in SW480 cells in various groups



A: MiR-325-3p mimics + oe-NC group; B: MiR-325-3p mimics + oe-PRELID1 group.

图8 转染后2组 SW480 细胞侵袭情况(结晶紫, $\times 400$)

Fig. 8 Invasion of SW480 cells in two groups after transfection(Crystal violet, $\times 400$)

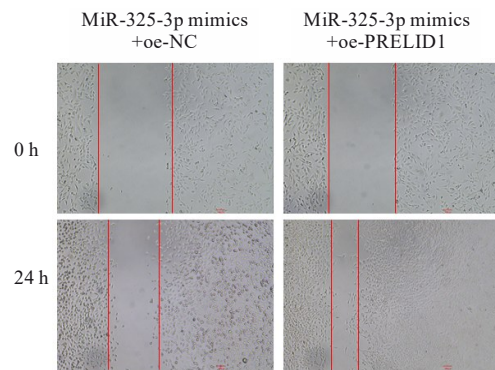


图9 转染后2组 SW480 细胞迁移情况($\times 200$)

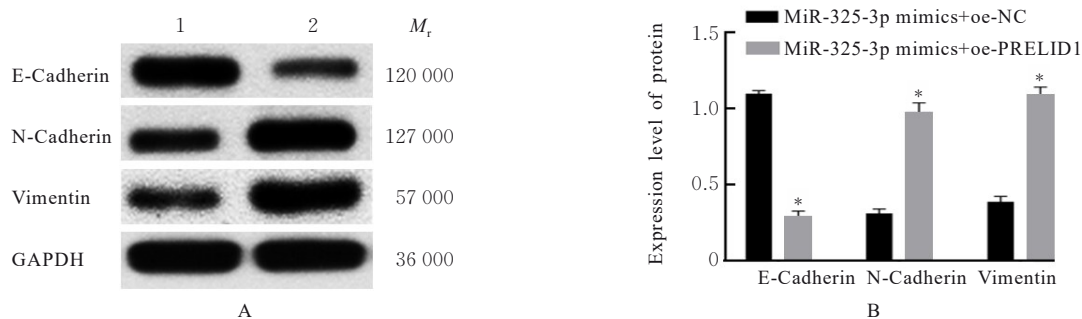
Fig. 9 Migration of SW480 cells in two groups after transfection($\times 200$)

2.7 miR-325-3p 和 PRELID1 共转染后 2 组细胞中 EMT 相关蛋白表达水平 与 miR-325-3p mimics + oe-NC 组比较, miR-325-3p mimics + oe-PRELID1 组细胞中 E-Cadherin 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), N-Cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图 10。

3 讨论

结肠癌是全球范围内一种普遍且致命的恶性肿

瘤, 其发生发展涉及多种因素和基因突变影响, 危险因素包括年龄、肥胖、吸烟、饮酒和不良饮食习惯等^[10-11]。流行病学数据^[12]显示: 20% 结肠癌患者初诊即存在远处转移, 超过 50% 的患者在 5 年内发生远处转移, 且转移患者中有 90% 因结肠癌失去生命。目前临床治疗策略以手术切除、放疗和化



Lane 1: MiR-325-3p mimics+oe-NC group; Lane 2: MiR-325-3p mimics+oe-PRELID1 group. * $P < 0.05$ vs miR-325-3p mimics+oe-NC group.

图10 转染后2组SW480细胞中EMT信号通路相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 10 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of EMT signaling pathway-related proteins in SW480 cells in two groups after transfection

疗为主^[13]。近年来,靶向和免疫治疗已成功应用于结肠癌,然而转移性患者的总体生存率和复发率仍未得到明显改善^[14]。因此,深入探讨结肠癌的发生发展机制对临床肿瘤转移有效控制和患者生存期延长具有重要意义。

多项研究揭示miR-325-3p在多种实体恶性肿瘤中发挥抑癌作用。LI等研究^[15]显示:与癌旁正常组织比较,肝细胞癌组织中miR-325-3p表达水平降低,过表达miR-325-3p可抑制肝癌细胞增殖、迁移和侵袭,并抑制血管生成。SUN等^[16]研究显示:miR-325-3p在胃癌组织中表达下调,过表达miR-325-3p可抑制胃癌细胞增殖并促进凋亡,且miR-325-3p通过调控SNHG6基因降低细胞顺铂耐药性。本研究结果显示:结肠癌组织中miR-325-3p表达降低,在SW480细胞中过表达miR-325-3p可抑制细胞侵袭和迁移;双荧光素酶报告实验证实PRELID1是miR-325-3p下游靶基因,两者表达呈负相关关系,且PRELID1过表达可促进结肠癌细胞侵袭和迁移。

EMT是参与肿瘤转移的核心机制之一,其主要特征为细胞上皮性状丢失(如细胞-细胞连接和顶端基底极性)和间质性状获得(如梭形细胞形状和间质标记),从而促进癌细胞从固定的上皮细胞转变为可移动的侵袭性间充质样细胞^[17-19]。本研究结果显示:miR-325-3p过表达后,SW480细胞中EMT相关蛋白E-Cadherin蛋白表达水平升高,N-Cadherin和Vimentin蛋白表达水平降低;上调PRELID1表达可逆转上述变化趋势。

综上所述,结肠癌组织中miR-325-3p低表达与PRELID1高表达呈负相关关系。过表达miR-325-3p

可靶向下调PRELID1表达,抑制EMT进程,进而抑制SW480细胞侵袭和迁移。PRELID1是miR-325-3p的靶基因,上调PRELID1表达能够逆转细胞上述改变。本研究局限性在于仅通过细胞实验验证该机制,后续需开展相关动物实验提供体内验证结果,为结肠癌发生发展机制提供新的思路。

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:

朱平胜和左芦根参与研究设计、实验操作及论文撰写,葛思堂和陈德利参与实验操作及数据分析,张洋洋参与论文审阅及修改。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33.
- [3] ALI SYEDA Z, LANGDEN S S S, MUNKHZUL C, et al. Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1723.
- [4] HE B X, ZHAO Z Y, CAI Q D, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(14): 2628-2647.
- [5] GAN H Z, LIN L, HU N J, et al. KIF2C exerts an oncogenic role in nonsmall cell lung cancer and is negatively regulated by miR-325-3p[J]. Cell Biochem

- Funct, 2019, 37(6): 424-431.
- [6] HUANG Z W, LUO Y C, CHEN C C, et al. miR-325-3p reduces proliferation and promotes apoptosis of gastric cancer cells by inhibiting human antigen R [J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2023, 2023: 6882851.
- [7] SUN S P, LIU F, XIAN S Z, et al. miR-325-3p overexpression inhibits proliferation and metastasis of bladder cancer cells by regulating MT3 [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e920331.
- [8] GILLEN A E, BRECHBUHL H M, YAMAMOTO T M, et al. Alternative polyadenylation of *PRELID1* regulates mitochondrial ROS signaling and cancer outcomes [J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(12): 1741-1751.
- [9] XU D F, WANG Y, ZHOU K L, et al. Development and validation of a novel 8 immune gene prognostic signature based on the immune expression profile for hepatocellular carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 8125-8140.
- [10] STEBBING J, SCHLECHTER B L. Genes and race in colon cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2024, 42(4): 369-372.
- [11] SNINSKY J A, SHORE B M, LUPU G V, et al. Risk factors for colorectal polyps and cancer [J]. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2022, 32(2): 195-213.
- [12] SACCHETTI A, TEEUWSEN M, VERHAGEN M, et al. Phenotypic plasticity underlies local invasion and distant metastasis in colon cancer [J]. *eLife*, 2021, 10: e61461.
- [13] AUDISIO A, FAZIO R, DAPRÀ V, et al. Neoadjuvant chemotherapy for early-stage colon cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2024, 123: 102676.
- [14] VERDINA A, GARUFI A, D'ORAZI V, et al. HIPK2 in colon cancer: a potential biomarker for tumor progression and response to therapies [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(14): 7678.
- [15] LI L, JI Y, CHEN Y C, et al. miR-325-3p mediate the CXCL17/CXCR8 axis to regulate angiogenesis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cytokine*, 2021, 141: 155436.
- [16] SUN T H, LI K, ZHU K, et al. SNHG6 interacted with miR-325-3p to regulate cisplatin resistance of gastric cancer by targeting GTR [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 12181-12193.
- [17] 崔萌菲, 王柯, 何晓彤, 等. 鼠源M2型巨噬细胞对KYSE30细胞克隆、侵袭、迁移及EMT相关蛋白表达的影响 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2023, 58(06): 746-750.
- [18] ZHANG N, NG A S, CAI S J, et al. Novel therapeutic strategies: targeting epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(8): e358-e368.
- [19] LEE J, YOU J H, KIM M S, et al. Epigenetic reprogramming of epithelial-mesenchymal transition promotes ferroptosis of head and neck cancer [J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101697.