

引用本文:宋德顺,程华.环状RNA肌球蛋白轻链激酶靶向微小RNA-497-5p调控结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J].安徽医药,2022,26(7):1355-1360.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.07.019.

◇临床医学◇



环状RNA肌球蛋白轻链激酶靶向微小RNA-497-5p 调控结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭

宋德顺,程华

作者单位:青岛市第八人民医院内镜诊疗科,山东 青岛 266100

通信作者:程华,女,主任医师,研究方向为消化道肿瘤,Email:fj2jk6@163.com

摘要: **目的** 探讨环状RNA肌球蛋白轻链激酶(circMYLK)对结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响和可能机制。**方法** 本研究2019年3月至2020年1月进行。实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测正常结肠上皮细胞(NCM460)和结肠癌细胞(SW480、SW620、Caco-2)中circMYLK和微小RNA-497-5p(miR-497-5p)表达水平。将circMYLK小干扰RNA(si-circMYLK)、miR-497-5p模拟物分别转染SW480细胞,采用细胞计数试剂盒(CCK-8)、Transwell实验分别检测干扰circMYLK或过表达miR-497-5p对SW480细胞增殖、迁移和侵袭的影响。双荧光素酶报告基因实验和RT-qPCR确定circMYLK对miR-497-5p的调控作用。**结果** 与NCM460细胞比较,结肠癌细胞中circMYLK表达(1.00 ± 0.06 比 3.39 ± 0.23 、 2.31 ± 0.24 、 2.98 ± 0.18)显著升高,miR-497-5p表达(1.00 ± 0.08 比 0.36 ± 0.04 、 0.63 ± 0.05 、 0.54 ± 0.05)显著降低($P < 0.05$)。干扰circMYLK表达后SW480、细胞活力、迁移和侵袭细胞数显著降低($P < 0.05$)。过表达miR-497-5p后SW480细胞活力、迁移和侵袭细胞数显著降低($P < 0.05$)。circMYLK靶向负性调控miR-497-5p表达。抑制miR-497-5p表达能够逆转干扰circMYLK对SW480细胞增殖、迁移和侵袭的影响,恢复细胞活力、迁移和侵袭能力($P < 0.05$)。**结论** 结肠癌细胞中circMYLK呈高表达,干扰circMYLK通过靶向miR-497-5p能够抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭。

关键词: 肌球蛋白轻链激酶; 结肠肿瘤; 微小RNA-497-5p; 增殖; 迁移; 侵袭

CircMYLK regulates the proliferation, migration and invasion of colon cancer cells by targeting miR-497-5p

SONG Deshun, CHENG Hua

Author Affiliation: Department of Endoscopy, Qingdao Eighth People's Hospital, Qingdao, Shandong 266100, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of circular RNA myosin light chain kinase (circMYLK) on the proliferation, migration and invasion of colon cancer cells and its possible mechanism. **Methods** This study was conducted from March 2019 to January 2020. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression levels of circMYLK and miR-497-5p in normal colon epithelial cells (NCM460) and colon cancer cells (SW480, SW620, Caco-2). The circMYLK small interfering RNA (si-circMYLK) and miR-497-5p mimics were transfected into SW480 cells, respectively. The cell counting kit (CCK-8) and Transwell experiments were used to detect the effects of interfering with circMYLK or overexpressing miR-497-5p on proliferation, migration and invasion of SW480 cells. The dual luciferase reporter gene experiment and RT-qPCR were used to determine the regulatory effect of circMYLK on miR-497-5p. **Results** Compared with NCM460 cells, the expression of circMYLK (1.00 ± 0.06 vs. 3.39 ± 0.23 , 2.31 ± 0.24 , 2.98 ± 0.18) in colon cancer cells was significantly increased, while the expression of miR-497-5p (1.00 ± 0.08 vs. 0.36 ± 0.04 , 0.63 ± 0.05 , 0.54 ± 0.05) was significantly reduced ($P < 0.05$). After interfering with circMYLK expression, the cell viability, migration and invasion cell numbers of SW480 were significantly reduced ($P < 0.05$). After overexpression of miR-497-5p, the cell viability, migration and invasion cell numbers of SW480 were significantly reduced ($P < 0.05$). circMYLK could target and negatively regulate miR-497-5p expression. Inhibiting the expression of miR-497-5p could reverse the effect of interfering with circMYLK on the proliferation, migration and invasion of SW480 cells, and restore cell viability, migration and invasion ability ($P < 0.05$). **Conclusions** CircMYLK is highly expressed in colon cancer cells. Interfering with circMYLK can inhibit the proliferation, migration and invasion of colon cancer cells by targeting miR-497-5p.

Key words: Myosin-light-chain kinase; Colonic neoplasms; miR-497-5p; Proliferation; Migration; Invasion

结肠癌发病率、死亡率分别在全球癌症排名中位列第三和第四位^[1]。由于生活方式、饮食习惯、生

活条件的改变,结肠癌发病率、死亡率呈逐年上升趋势。早期结肠癌缺乏特征性症状,不易发现,且

手术治疗效果不佳和化疗耐药,复发转移率较高,已成为威胁人类健康的重要公共卫生问题^[2]。因此,探讨结肠癌发生发展的分子机制、寻找新的治疗策略迫在眉睫,对提高结肠癌的诊断、治疗和预后意义重大。环状RNA(circRNA, circular RNA)由单个具有基因调控潜能的mRNA前体反向剪接而成。越来越多的证据表明, circRNA与人类疾病尤其是癌症关系密切,由于其性质稳定, circRNA具有潜在生物标志物作用^[3-4]。研究显示, circRNA肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MYLK)在前列腺癌中显著上调并促进癌细胞的增殖、迁移和侵袭,提示肌球蛋白轻链激酶(circMYLK)可能是一种致癌基因^[5]。序列分析发现,微小RNA-497-5p(miR-497-5p)与circMYLK存在理论互补结合位点。miR-497-5p已被证实结肠癌中表达下调,上调miR-497-5p表达抑制结肠癌进展^[6]。然而, circMYLK能否靶向miR-497-5p参与结肠癌进展尚未可知。因此,于2019年3月至2020年1月本研究旨在通过体外细胞实验揭示circMYLK在结肠癌中的作用和可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 结肠癌细胞SW480、SW620、Caco-2以及正常结肠上皮细胞NCM460购于中国典型培养物保藏中心;RPMI-1640培养基、DMEM培养基购于美国Gibco公司;胎牛血清、青链霉素双抗溶液购于北京索莱宝生物科技有限公司;Taqman miRNA逆转录试剂盒、TRIzol试剂购于美国Invitrogen公司;PrimeScript RT reagent Kit、SYBR Green Master Mix购于大连TaKaRa生物公司;细胞计数试剂盒(CCK-8)、放射免疫沉淀试验(RIPA)缓冲液、二喹啉甲酸(BCA)蛋白分析试剂盒、购于南京凯基生物公司;Transwell小室和基质胶购于美国BD公司;兔源细胞周期蛋白D1(cyclinD1)单克隆抗体、兔源P21单克隆抗体、兔源基质金属蛋白酶2(MMP-2)单克隆抗体、兔源MMP-9单克隆抗体、兔源磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、山羊抗兔IgG购于上海艾博抗公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SW480、SW620、Caco-2细胞均采用RPMI-1640培养基进行培养, NCM460细胞采用DMEM培养基进行培养所有培养基中均补充10%的胎牛血清、100 U/mL的青霉素和100 μg/mL的链霉素。当细胞生长至汇合度80%时,按照1:4比例进行消化传代。

1.2.2 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测 circMYLK 和 miR-497-5p 表达 采用TRIzol试剂分别

提取 NCM460、SW480、SW620、Caco-2 细胞中总RNA。用Taqman miRNA逆转录试剂盒将miRNA转化为cDNA。用3 U/mg RNase R于37℃条件下孵育总RNA 15 min,利用PrimeScript RT reagent Kit将mRNA转化为cDNA。以cDNA为扩增模板,利用SYBR Green Master Mix进行RT-qPCR扩增。以GAPDH、U6为内参照基因,2^{-ΔΔCt}法分析circMYLK和miR-497-5p的相对表达水平。circMYLK正向引物序列5'-CAATCTTCTTATGCGGCGG-3',反向引物序列5'-GTACCGGCGCAGTCAGG-3'; miR-497-5p正向引物序列5'-AGCGAAGTTTTGAGCCGATCGGGC-3',反向引物序列5'-GCCGTGAGTCAGAGTGGT-3'; GAPDH正向引物序列5'-ATCCACGGGAGAGCGACAT-3',反向引物序列5'-CAGCTGCTTGTAAGTGGAC-3'; U6正向引物序列5'-ACAGATCTGTCGGTGTGGCAC-3',反向引物序列5'-GGCCCCGGATTATCCGACATTC-3'。

1.2.3 细胞转染、细胞分组 按照2×10⁵个/孔的密度将对数期SW480细胞接种6孔板,当细胞50%汇合时更换不含血清培养基进行细胞转染。首先,取50 pmol的待转染物阴性对照(si-NC)、干扰circMYLK(si-circMYLK)、过表达对照(miR-NC)、miR-497-5p模拟物(miR-497-5p mimics)、干扰circMYLK+抑制物对照(si-circMYLK+anti-miR-NC)、干扰circMYLK+miR-497-5p抑制物(si-circMYLK+anti-miR-497-5p)与适量无血清培养基混合,使其总体积为25 μL,记为混合物A。取1 μL的Lipofectamine 3000与24 μL无血清培养基混合,记为混合物B。室温静置5 min后,将混合物A和混合物B混合均匀,记为混合物C。将混合物C加入到细胞汇合度为50%的培养基中,6 h后更换为含血清培养基,转染48 h时收集细胞,RT-qPCR测定转染效果,合格后进行后续实验。

1.2.4 CCK-8法检测细胞活力 按照5×10³个/孔的密度将各转染组细胞接种96孔板,在培养24 h、48 h、72 h时各取出一板细胞,按照10 μL/孔加入CCK-8试剂,暗室孵育1 h后,采用酶标仪测定细胞在450 nm处的光密度(optical density, OD)值以反映细胞的增殖活性。

1.2.5 Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力 迁移实验时取200 μL无血清培养液稀释的各组细胞悬液(2×10⁵个/毫升)加入到Transwell上腔室,取600 μL含10%胎牛血清的培养液加入到24孔下室作为趋化剂。37℃孵育24 h后,用棉签擦去上室未迁移细胞,用1%多聚甲醛固定至下室膜,0.5%结晶紫染色,然后在光学显微镜下随机选择五个视野计

数和拍照,以其均数表示细胞迁移细胞数。侵袭实验时采用涂有基质胶的 Transwell 小室,其余步骤同迁移实验。

1.2.6 蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测 CyclinD1、P21、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平 采用放射免疫沉淀试验缓冲液提取总蛋白,BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白浓度。取适量蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移到 PVDF 膜上。用 5% 牛血清白蛋白室温封闭膜 1 h 后,将膜至于稀释的一抗溶液中 4 ℃ 孵育过夜,再用稀释的二抗室温孵育膜 1 h。用电化学发光显色试剂盒进行显影、曝光。以 GAPDH 为内参,用 Bio-Rad Quantity One 软件分析对单个蛋白条带进行灰度分析。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验 Starbase 数据库在线分析显示 circMYLK 与 miR-497-5p 存在连续互补结合位点。将含有 miR-497-5p 预测结合位点或预测结合位点突变序列的 circMYLK 克隆到 pGL3-REPORT 双荧光素酶载体中,获得荧光素酶报告基因载体 WT-circMYLK 和 MUT-circMYLK。以 Lipofectamine 3000 作为转染试剂,将 WT-circMYLK 和 MUT-circMYLK 分别与 miR-497-5p mimics 或 miR-NC 转染到 SW480 细胞中。培养 48 h 后收集细胞,使用双荧光素酶报告基因系统测定荧光素酶活性。为确定 circMYLK 对 miR-497-5p 表达的调控作用,将 pcDNA、pcDNA-circMYLK、si-NC、si-circMYLK 分别转染 SW480 细胞,转染 48 h 时,检测各组细胞 miR-497-5p 的相对表达水平。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 进行统计分析。每组设置 3 个平行实验,重复 3 次。计量资料满足正态性和方差齐性用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。采用 *t* 检验比较两组间差异;采用单因素方差分析比较多组间差异,进一步多重比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circMYLK 和 miR-497-5p 在结肠癌细胞中的表达 结肠癌细胞 SW480、SW620、Caco-2 中 circ-

MYLK 表达较正常结肠上皮细胞 NCM460 显著升高 ($P < 0.05$), miR-497-5p 表达较 NCM460 细胞显著降低 ($P < 0.05$)。见表 1。选择 SW480 细胞进行后续研究。

表1 circMYLK 和 miR-497-5p 在结肠癌细胞中的表达/ $\bar{x} \pm s$

细胞	重复次数	circMYLK	miR-497-5p
NCM460	9	1.00±0.06	1.00±0.08
SW480	9	3.39±0.23 ^①	0.36±0.04 ^①
SW620	9	2.31±0.24 ^①	0.63±0.05 ^①
Caco-2	9	2.98±0.18 ^①	0.54±0.05 ^①
<i>t</i> 值		268.92	201.12
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: circMYLK 为肌球蛋白轻链激酶, miR-497-5p 为微小 RNA-497-5p。

①与 NCM460 细胞比较, $P < 0.05$ 。

2.2 干扰 circMYLK 表达对 SW480 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 si-circMYLK 组 SW480 细胞 circ-MYLK 的表达水平较 si-NC 组显著降低 ($t = 18.44$, $P < 0.05$), 表明转染 si-circMYLK 后 SW480 细胞中 circ-MYLK 表达受到抑制。干扰 circMYLK 表达后 SW480 细胞 OD₄₅₀ 值、迁移和侵袭细胞数、CyclinD1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达显著降低 ($t = 18.97$, 13.76, 15.02, 17.73, 31.62, $P < 0.05$), P21 蛋白表达显著升高 ($t = 24.15$, $P < 0.05$)。见表 2。

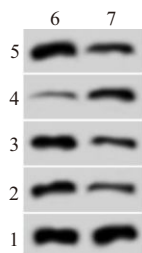
2.3 miR-497-5p 过表达对 SW480 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 miR-497-5p 组 SW480 细胞中 miR-497-5p 表达水平较 miR-NC 组显著升高 ($P < 0.05$), 说明转染 miR-497-5p mimics 后 SW480 细胞中 miR-497-5p 表达得到上调。过表达 miR-497-5p 后 SW480 细胞 OD₄₅₀ 值、迁移和侵袭细胞数、CyclinD1、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达显著降低 ($t = 17.54$, 8.78, 13.17, 18.34, 17.49, 18.60, $P < 0.05$), P21 蛋白表达显著升高 ($t = 22.14$, $P < 0.05$)。见图 1, 表 3。

2.4 circMYLK 靶向调控 miR-497-5p 的表达 StarBase 数据库在线分析显示, circMYLK 与 miR-497-5p 存在理论互补结合位点, 见图 2。双荧光素酶报告实验显示, miR-497-5p mimics 和 WT-circ-

表2 干扰 circMYLK 表达对 SW480 细胞增殖、迁移和侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

分组	重复次数	circMYLK	OD 值 (450 nm)			迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	CyclinD1 蛋白	P21 蛋白	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
			24 h	48 h	72 h						
si-NC	9	1.00±0.06	0.41±0.04	0.77±0.06	1.31±0.11	95.52±7.89	77.24±7.01	0.73±0.07	0.15±0.02	0.63±0.05	0.59±0.03
si-circMYLK	9	0.52±0.05	0.28±0.02	0.44±0.04	0.57±0.04	52.66±5.01	38.93±3.07	0.28±0.03	0.51±0.04	0.24±0.02	0.21±0.02
<i>t</i> 值		18.44	8.72	13.73	18.97	13.76	15.02	17.73	24.15	21.73	31.62
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: circMYLK 为肌球蛋白轻链激酶, CyclinD1 为细胞周期蛋白 D1, P21 为周期素依赖激酶抑制剂, MMP-2 为基质金属蛋白酶-2, MMP-9 为基质金属蛋白酶-9。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—基质金属蛋白酶-9(MMP-9);3—基质金属蛋白酶-2(MMP-2);4—细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1(P21);5—细胞周期蛋白D1(CyclinD1);6—过表达对照(miR-NC);7—miR-497-5p模拟物(miR-497-5p)。

图1 miR-497-5p过表达对SW480细胞增殖、迁移和侵袭相关蛋白表达的影响

WT-circMYLK 5' gagggCAAGAAGCUGCUGCUc 3'
miR-497-5p 3' uguuuGGUGUCACACGACGAc 5'
MUT-circMYLK 5' gagggAAGGCAGCGUACUAGc 3'

图2 circMYLK的序列中含有与miR-497-5p互补的核苷酸序列

MYLK共转染组SW480细胞的相对荧光素酶活性较miR-NC和WT-circMYLK共转染组显著降低($t=26.71, P<0.05$);而miR-497-5p mimics和MUT-circMYLK共转染组SW480细胞的相对荧光素酶活性与miR-NC和MUT-circMYLK共转染组比较无变化($t=0.98, P>0.05$),见表4。

表4 双荧光素酶报告实验/ $\bar{x} \pm s$

分组	重复次数	WT-circMYLK	MUT-circMYLK
miR-NC	9	0.98±0.05	0.97±0.06
miR-497-5p	9	0.41±0.04	1.00±0.07
t 值		26.71	0.98
P 值		<0.001	0.344

注:miR-NC为过表达对照,miR-497-5p为微小RNA-497-5p。

pcDNA-circMYLK组SW480细胞miR-497-5p表达 0.54 ± 0.05 较pcDNA组 1.00 ± 0.05 显著降低($t=19.52, P<0.05$);si-circMYLK组SW480细胞miR-497-5p表达 3.07 ± 0.22 较si-NC组 0.98 ± 0.09 显著升高($t=26.38, P<0.05$);四组总体SW480细胞miR-497-5p表达比较 $F=754.12, P<0.001$ 。

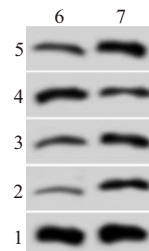
2.5 抑制miR-497-5p表达逆转了干扰circMYLK

表3 miR-497-5p过表达对SW480细胞增殖、迁移和侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

分组	重复次数	miR-497-5p	OD值(450 nm)			迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	CyclinD1蛋白	P21蛋白	MMP-2蛋白	MMP-9蛋白
			24h	48h	72h						
miR-NC	9	1.00±0.08	0.43±0.03	0.78±0.07	1.42±0.12	97.41±9.16	79.34±6.87	0.76±0.06	0.14±0.02	0.64±0.05	0.58±0.04
miR-497-5p	9	2.88±0.19	0.34±0.03	0.51±0.04	0.66±0.05	64.58±6.48	43.56±4.39	0.35±0.03	0.47±0.04	0.30±0.03	0.27±0.03
t 值		27.36	6.36	10.05	17.54	8.78	13.17	18.34	22.14	17.49	18.60
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.000

注:miR-497-5p为微小RNA-497-5p,CyclinD1为细胞周期蛋白D1,P21为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1,MMP-2为基质金属蛋白酶-2,MMP-9为基质金属蛋白酶-9。

表达对SW480细胞增殖、迁移和侵袭的作用 si-circMYLK+anti-miR-497-5p组SW480细胞miR-497-5p的表达较si-circMYLK+anti-miR-NC组显著降低($t=9.99, P<0.05$),细胞OD₄₅₀值、迁移和侵袭细胞数、CyclinD1、MMP-2和MMP-9蛋白表达较si-circMYLK+anti-miR-NC组显著升高($t=15.38, 16.02, 14.32, 18.01, 20.80, 23.30, P<0.05$),P21蛋白表达较si-circMYLK+anti-miR-NC组显著降低($t=9.01, P<0.05$)。见图3,表5。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—基质金属蛋白酶-9(MMP-9);3—基质金属蛋白酶-2(MMP-2);4—细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1(P21);5—细胞周期蛋白D1(CyclinD1);6—干扰circMYLK+抑制物对照(si-circMYLK+anti-miR-NC);7—干扰circMYLK+抑制物miR-497-5p(si-circMYLK+anti-miR-497-5p)。

图3 抑制miR-497-5p表达逆转了干扰circMYLK表达对SW480细胞增殖、迁移和侵袭相关蛋白表达的作用

3 讨论

circRNA是一种内源性RNA,主要在真核转录组中表达,参与调控基因表达,在肿瘤发生发展中发挥重要作用^[7]。本研究通过探讨circMYLK在结肠癌中调节机制,以期对未来肿瘤的预防和治疗提供新思路。

circMYLK是调节肌球蛋白功能的重要分子,对细胞骨架、细胞增殖和肌肉收缩均有影响。近年研究发现,circMYLK在多种肿瘤进展中发挥致癌因子作用。例如,circMYLK在肾细胞癌中表达上调,circMYLK高表达与肿瘤体积增加、远端转移和较差的预后相关,沉默circMYLK能够抑制肿瘤的生长和转移^[8]。circMYLK在喉鳞癌中亦呈表达增加,circMYLK高表达促进喉鳞癌细胞增殖和G1/S细胞周期过渡,而敲除circMYLK则有相反的效果^[9]。此

表5 抑制 miR-497-5p 表达逆转了干扰 circMYLK 表达对 SW480 细胞增殖、迁移和侵袭的作用/ $\bar{x} \pm s$

分组	重复 次数	miR-497-5p	OD 值(450 nm)			迁移细胞 数/个	侵袭细胞 数/个	CyclinD1 蛋白	P21 蛋白	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
			24 h	48 h	72 h						
si-circMYLK+anti-miR-NC	9	1.00±0.09	0.27±0.03	0.43±0.04	0.56±0.04	50.74±3.44	37.69±3.73	0.27±0.03	0.53±0.05	0.22±0.02	0.20±0.02
si-circMYLK+anti-miR-497-5p	9	0.64±0.06	0.39±0.03	0.66±0.04	1.16±0.11	86.52±5.75	67.81±5.09	0.62±0.05	0.34±0.02	0.53±0.04	0.48±0.03
t值		9.99	8.49	12.20	15.38	16.02	14.32	18.01	9.01	20.80	23.30
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: si-circMYLK+anti-miR-NC 为干扰 circMYLK+抑制物对照, si-circMYLK+anti-miR-497-5p 为干扰 circMYLK+抑制物 miR-497-5p。CyclinD1 为细胞周期蛋白 D1, P21 为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1, MMP-2 为基质金属蛋白酶-2, MMP-9 为基质金属蛋白酶-9。

外,敲除 circMYLK 对肝细胞进展也具有显著的抑制作用^[10]。与前任研究类似,本研究发现结肠癌细胞中 circMYLK 表达较正常结肠上皮细胞 NCM460 显著升高,提示 circMYLK 高表达可能与结肠癌细胞的异常生物学行为有关。采用结肠癌细胞 SW480 进行功能分析发现,转染 si-circMYLK 干扰 circMYLK 可显著降低 SW480 细胞活力、迁移和侵袭能力。P21 是细胞增殖的负性调控因子,其通过抑制细胞周期依赖性激酶活性具有阻止 G1/S 期转换作用,而 CyclinD1 则参与 G1/S 期转换进而发挥胞增殖正性调控作用^[11]。MMP-2 和 MMP-9 是一类依赖锌的蛋白酶,其通过降解细胞外基质和基底膜胶原蛋白在促进肿瘤浸润、转移中发挥重要作用^[12]。本研究发现,干扰 circMYLK 可降低 CyclinD1、MMP-2 和 MMP-9 表达水平,提高 P21 表达,与功能分析相吻合,这进一步说明 circMYLK 在结肠癌中的致癌作用,干扰 circMYLK 可有效抑制 SW480 细胞的恶性生物学行为。

目前,多项研究证实 circRNA 通过与 miRNA 相互作用,使 miRNA 失去自身功能,调控下游靶基因,从而影响肿瘤的生物行为^[13-14]。例如 circRNA_103809 通过抑制 miR-532-3p 表达减轻 miR-532-3p 对叉头样转录因子 O4 (Forkhead Box O4, FOXO4) 的抑制作用进而影响结直肠癌细胞的增殖、迁移和凋亡^[15]。为探索 circMYLK 在结肠中的作用机制,本研究通过序列分析发现 miR-497-5p 可能含有 circMYLK 的结合位点。miR-497-5p 属于 miR-15/107 簇,已有报道显示肝细胞癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌中 miR-497-5p 表达下调,过表达 miR-497-5p 可降低肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[16-18]。本研究发现,结肠癌细胞中 miR-497-5p 表达降低,过表达 miR-497-5p 可降低 SW480 细胞活力,抑制其迁移和侵袭能力,表明 miR-497-5p 在结肠癌中具有抑癌作用,与 Gharib E 等^[19]研究结论相一致。进一步研究发现,过表达 miR-497-5p 可降低 SW480 细胞中 circMYLK-WT 的相对荧光素酶活性,且 circMYLK 对 miR-497-5p 具有负调控作用。此外,本研究发现抑制 miR-497-5p 表达还可逆转干扰 circ-

MYLK 对 SW480 细胞活力、迁移侵袭和相关蛋白表达的影响,恢复细胞的增殖、迁移和侵袭能力,这进一步说明 circMYLK 在结肠癌中的致癌作用与负调控 miR-497-5p 表达有关。

综上所述,结肠癌细胞中 circMYLK 呈高表达,干扰 circMYLK 通过靶向 miR-497-5p 能够抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭。因此, circMYLK/miR-497-5p 分子轴是结肠癌的潜在治疗靶点,为未来结肠癌的防治提供了新的方向。

参考文献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, FEDEWA SA, et al. Colorectal cancer statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67 (3): 177-193.
- [2] WEN J, MIN X, SHEN M, et al. ACLY facilitates colon cancer cell metastasis by CTNNB1 [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38 (1): 401-411.
- [3] QU S, LIU Z, YANG X, et al. The emerging functions and roles of circular RNAs in cancer [J]. Cancer Lett, 2018, 414 (1): 301-309.
- [4] VERDUCI L, STRANO S, YARDEN Y, et al. The circRNA-microRNA code: emerging implications for cancer diagnosis and treatment [J]. Mol Oncol, 2019, 13(4): 669-680.
- [5] DAI Y, LI D, CHEN X, et al. Circular RNA myosin light chain kinase (MYLK) promotes prostate cancer progression through modulating Mir-29a expression [J]. Med Sci Monit, 2018, 24 (1): 3462-3471.
- [6] HONG S, YAN Z, WANG H, et al. Up-regulation of microRNA-497-5p inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion via targeting PTPN3 [J]. Biosci Rep, 2019, 39 (8): BSR20191123. DOI:10.1042/BSR20191123.
- [7] KRISTENSEN LS, HANSEN TB, VENØ MT, et al. Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field [J]. Oncogene, 2018, 37(5): 555-565.
- [8] LI J, HUANG C, ZOU Y, et al. Circular RNA MYLK promotes tumour growth and metastasis via modulating miR-513a-5p/VEG-FC signalling in renal cell carcinoma [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(12):6609-6621.
- [9] DUAN X, SHEN N, CHEN J, et al. Circular RNA MYLK serves as an oncogene to promote cancer progression via microRNA-195/cyclin D1 axis in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Biosci Rep, 2019, 39(9): BSR20190227. DOI: 10.1042/BSR20190227.

- [10] LI Z, HU Y, ZENG Q, et al. Circular RNA MYLK promotes hepatocellular carcinoma progression by increasing Rab23 expression by sponging miR-362-3p[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19(1): 211-220.
- [11] LANGNER E, NUNES FM, POŻAROWSKI P, et al. Melanoids isolated from heated potato fiber (Potex) affect human colon cancer cells growth via modulation of cell cycle and proliferation regulatory proteins [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 57(1): 246-255.
- [12] JUAN TK, LIU KC, KUO CL, et al. Tetrandrine suppresses adhesion, migration and invasion of human colon cancer SW620 cells via inhibition of nuclear factor- κ B, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 signaling pathways [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7716-7724.
- [13] QI X, ZHANG DH, WU N, et al. ceRNA in cancer: possible functions and clinical implications [J]. *J Med Genet*, 2015, 52(10): 710-718.
- [14] 高博文, 罗宇明, 孔瑶, 等. circRNA-CHD2 通过 miR-30e-3p/MDM2/TP53 轴促进胰腺癌侵袭转移[J/OL]. *中华普通外科学文献(电子版)*, 2022, 16(1): 14-19. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0793.2022.01.003.
- [15] BIAN L, ZHI X, MA L, et al. Hsa_circRNA_103809 regulated the cell proliferation and migration in colorectal cancer via miR-532-3p/FOXO4 axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(2): 346-352.
- [16] XU GS, LI ZW, HUANG ZP, et al. MiR-497-5p inhibits cell proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by targeting insulin-like growth factor 1 [J/OL]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(10): e00860-e00870. DOI: 10.1002/mgg3.860.
- [17] CHAI L, KANG XJ, SUN ZZ, et al. MiR-497-5p, miR-195-5p and miR-455-3p function as tumor suppressors by targeting hTERT in melanoma A375 cells [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10(6): 989-1003.
- [18] LI G, WANG K, WANG J, et al. miR-497-5p inhibits tumor cell growth and invasion by targeting SOX5 in non-small-cell lung cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 10587-10595.
- [19] GHARIB E, NASRI NASRABADI P, REZA ZALI M. miR-497-5p mediates starvation-induced death in colon cancer cells by targeting acyl-CoA synthetase-5 and modulation of lipid metabolism [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(7-8): 5570-5589.

(收稿日期:2020-06-30,修回日期:2022-03-20)

引用本文:陈子民,叶明,叶晓烁,等.新生儿期肝脏巨大血管瘤的外科诊治[J].安徽医药,2022,26(7):1360-1363.
DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.07.020.

◇临床医学◇



新生儿期肝脏巨大血管瘤的外科诊治

陈子民,叶明,叶晓烁,孙俊,高家辉,吴宙光

作者单位:深圳市儿童医院普外二科,广东 深圳 518026

基金项目:深圳市医疗卫生三名工程(SZSM201812055)

摘要: **目的** 探讨总结新生儿肝脏巨大血管瘤的外科诊治经验。**方法** 回顾深圳市儿童医院2014—2018年收治并采用外科手术治疗的8例新生儿肝脏巨大血管瘤病例,分析其临床资料和外科治疗效果。**结果** 8例新生儿肝脏血管瘤首诊症状包括腹部包块、黄疸。1例合并破裂出血、6例合并动静脉瘘及严重的心衰表现,1例合并呼吸衰竭。全部病例产后超声和CT检查均有典型的血管瘤表现,单个病灶直径在6.5~10 cm。所有患儿均接受手术并完整切除,1例术后1 d出现胆漏,其他远期并发症随访期间尚未发现,手术效果良好。术后病理报告海绵状血管瘤5例,血管内皮瘤3例。术后随访3~52个月,复查肿瘤均未复发,甲胎蛋白(AFP)恢复正常,所有患儿生长发育同正常儿。**结论** 新生儿肝脏巨大血管瘤可通过临床表现、超声和CT检查明确诊断。合并内科治疗棘手的破裂出血所致休克、心衰或者呼吸衰竭患儿,紧急手术治疗新生儿肝脏血管瘤是可行的,疗效满意。

关键词: 肝肿瘤; 肝切除术; 血管瘤; 肝肿大; 动静脉瘘; 婴儿,新生

Surgical diagnosis and treatment of neonatal giant hepatic hemangioma

CHEN Zimin, YE Ming, YE Xiaoshuo, SUN Jun, GAO Jiahui, WU Zhouguang

Author Affiliation: Ward II of General Surgery, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518026, China

Abstract: **Objective** To explore the experience of surgical diagnosis and treatment of neonatal giant hepatic hemangioma. **Methods** Eight cases of neonatal hepatic giant hemangioma who were admitted and treated surgically in Shenzhen Children's Hospital from 2014 to 2018 were retrospectively reviewed, and their clinical data and surgical treatment effects were analyzed. **Results** The first symptoms of 8 neonates with hepatic hemangioma included abdominal mass and jaundice. One case was complicated with rupture and bleeding, 6 cases with arteriovenous fistula and severe heart failure, 1 case with respiratory failure. Postpartum ultrasound and CT examination showed typi-