

网络出版时间: 2023-04-03 15:13:46 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230403.1101.002.html>

ROR γ 基因对结肠癌细胞增殖及迁移的影响

方昌义¹, 潘晓飞², 余昌俊¹, 武平², 陈本鑫², 李宝², 张干², 龚玉勇², 李洋²

摘要 目的 探究维甲酸相关孤儿核受体- γ (ROR γ) 基因对人结肠癌细胞增殖、转移能力的影响。方法 通过构建 ROR γ 敲减细胞系, 采用 RT-qPCR 及 Western blot 检测敲减效率; MTT、克隆形成、Transwell 和划痕实验检测细胞增殖与转移能力; 采用 Western blot 检测上皮间质转化 (EMT) 相关蛋白的表达情况; 通过 TIMER 2.0 数据库分析 ROR γ 基因的表达与肿瘤微环境中免疫细胞浸润的关系。结果 ROR γ 基因的敲减增强了结肠癌细胞的活力 (F 值 = 157.40, $P < 0.01$)、克隆形成能力 ($F = 61.35$, $P < 0.01$)、迁移能力 ($F = 13.00$, $P < 0.01$)、侵袭能力 ($F = 21.26$, $P < 0.01$) 和划痕愈合能力 ($F = 877.2$, $P < 0.01$), 抑制了上皮型钙黏附蛋白

(E-Cadherin) 的表达, 并促进了波形蛋白 (vimentin) 和神经型钙黏附蛋白 (N-Cadherin) 的表达; TIMER 2.0 数据库分析显示结肠腺癌 (COAD) 组织中 ROR γ 的表达水平与多种免疫细胞浸润相关。结论 ROR γ 表达的下调促进结肠癌细胞的增殖及转移。

关键词 结肠癌; 维甲酸相关孤儿核受体- γ ; 免疫浸润; 增殖; 迁移

中图分类号 R 735.35

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)04-0603-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.014

2023-02-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81902451); 安徽高校自然科学基金项目 (编号: KJ2020A0961、KJ2021ZD0025)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院普外科胃肠外科一病区, 合肥 230022

² 皖西卫生职业学院附属医院普外科三病区, 六安 237000

作者简介: 方昌义, 男, 博士研究生, 副主任医师;

潘晓飞, 男, 教授, 主任医师, 责任作者, E-mail: 461046693@qq.com;

余昌俊, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yuchangjun321@163.com

据最新全球癌症统计, 2020 年新发结肠癌约 114 万例, 死亡人数超 57 万例, 结肠癌成为癌症相关死亡的第二大原因^[1]。尽管目前治疗手段很多, 但是由于缺乏高效、特异性的生物标志物, 对结肠癌的早期诊断及治疗仍是目前研究的热点。维甲酸相关孤儿核受体- γ (retinoid-related orphan receptor gamma, ROR γ) 是一种在器官中广泛表达的孤儿受体, 作为 ROR 家族成员之一, 参与多种肿瘤的发生与发展^[2]。近些年, 有研究^[3]表明 ROR γ 在肿瘤中扮演癌基因的角色, 也有研究^[4]表明 ROR γ 在一些癌症中低表达, 发挥抑癌作用。由此可见, ROR γ 在

age of total 216 subjects were between 18 and 85 years old. To construct a cancer risk prediction model based on *H4C6* methylation level and cfDNA concentration and evaluate the predictive performance of the model. **Methods** cfDNA was extracted from blood samples using magnetic beads. Qubit 4.0 fluorescence quantitative meter was used to detect the concentration of cfDNA. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) technology was used to detect the methylation level of *H4C6* in cfDNA. Logistic regression algorithm was used to construct a cancer risk prediction model of *H4C6* methylation level combined with cfDNA concentration. The accuracy of the model was assessed using receiver operating characteristic (ROC) curve and calibration curve. The clinical benefit of the model was assessed using decision curve analysis (DCA). **Results** The model was constructed by combining *H4C6* methylation level and cfDNA concentration to distinguish lung cancer, liver cancer, colorectal cancer, gastric cancer, pancreatic cancer from healthy control group had the area under curve (AUC) of 0.769, 0.988, 0.934, 0.922, 0.830, respectively. The mean absolute error of the calibration curve was less than 0.05; the net benefit of the DCA curve was greater than 0. **Conclusion** The cancer risk prediction model based on *H4C6* methylation level and cfDNA concentration has good predictive performance, which helps to provide reasonable and effective suggestions for preclinical decision-making, and ultimately may provide patients with targeted and personalized cancer detection and diagnosis program.

Key words *H4C6* methylation level; cfDNA concentration; cancer risk prediction

不同肿瘤中可能发挥着不同作用。然而,目前关于 $ROR\gamma$ 在结肠癌中的研究较少。课题组前期通过生物信息学的方法研究^[3]表明, $ROR\gamma$ 在结肠癌中低表达,且与肿瘤分期、淋巴结转移和肝转移显著相关,影响患者预后,有望成为结肠癌的诊断、预后生物标志物。该研究通过细胞功能实验,从细胞水平验证 $ROR\gamma$ 对人结肠癌细胞增殖、迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

1.1.1 主要细胞 人结肠癌细胞 SW480 取自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂 DMEM、Opti-MEM 培养基、转染试剂 Lipofectamine 2000(货号: 11668019) 购自美国 Invitrogen 公司; 血清购自美国 Hyclone 公司; 总 RNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司; si- $ROR\gamma$ 质粒购自上海吉玛公司; 抗 $ROR\gamma$ 抗体购自美国 Abcam 公司(货号: ab78007) (稀释度: 1 : 1 000); 抗 β -actin 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司(货号: #4967) (稀释度: 1 : 1 000); 上皮型钙黏附蛋白(E-Cadherin) (货号: 20874-1-AP)、神经型钙黏附蛋白(N-Cadherin) (货号: 22018-1-AP) 和波形蛋白(vimentin) (货号: 60330-1-AP) 购自美国 Proteintech 公司(稀释度: 1 : 1 000); 二抗购自美国 Signalway Antibody 公司(货号: #L3012) (稀释度: 1 : 5 000); 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物[B-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 购自上海粒成生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 二氧化碳培养箱(型号: NU-5810E)、生物安全柜(型号: NU-425-400S) 购于美国 NUAIRE 公司; 荧光定量 PCR 仪(型号: Step One Plus ABI) 购于美国 Thermo 公司; 倒置荧光显微镜(型号: DeltaVision) 购于美国 GE 公司; 微量核酸蛋白紫外分析仪(型号: Genove Nano) 购于英国 JENWAY 公司。

1.2 数据库分析 通过 TIMER 2.0(<http://timer.cistrome.org/>) 数据库在线分析 $ROR\gamma$ 基因在结肠腺癌(colon adenocarcinoma, COAD) 中的 mRNA 表达水平与免疫细胞浸润程度的相关性。相关性系数 $Rho > 0$, 且 $P < 0.05$ 为两者呈正相关; 相关性系数 $Rho < 0$, 且 $P < 0.05$ 则认为两者呈负相关。

1.3 细胞培养与转染 结肠癌细胞用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗(青链霉素)的 DMEM 培养基,并

置于 5% CO_2 、37 °C 的加湿环境的培养箱中培养。采用说明书推荐的操作步骤,使用 Lipofectamine 2000,对呈对数生长期的结肠癌细胞进行转染 siRNA,分为敲低组(si- $ROR\gamma$ -1、si- $ROR\gamma$ -2)、对照组(si-NC)。si- $ROR\gamma$ -1 的正义链序列为: 5'-CGAG-GATGAGATTGCCCTCTA-3'; si- $ROR\gamma$ -2 的正义链序列为: 5'-CACCTCACAAATTGAAGTGAT-3'; 对照组 si-NC 的正义链序列为: 5'-UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT-3'。转染 48 h 后,提取总 RNA 及总蛋白,通过定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)和 Western blot 实验检测针对 $ROR\gamma$ 的敲低效率,以确定 $ROR\gamma$ 敲减细胞模型是否构建成功。

1.4 RNA 提取与 RT-qPCR 细胞总 RNA 的提取、RNA 的逆转录及 RT-qPCR 的方法参课题组前期发表的文章^[3]。靶向 $ROR\gamma$ 的正向引物序列: 5'-CGTTTGTAGGAACACAGGCA-3'; 靶向 $ROR\gamma$ 的反向引物序列: 5'-GAGAAGATGTTGGAGCGCTG-3'; 靶向内参 β -actin 的正向引物序列: 5'-CATCCG-CAAAGACCTGTACG-3'; 靶向内参 β -actin 的反向引物序列: 5'-CCTGCTTGCTGATCCACATC-3'。

1.5 Western blot 实验 结肠癌细胞转染 siRNA 48 h 后, PBS 清洗细胞 3 次,用含有蛋白酶抑制剂的裂解液加入培养皿中裂解细胞,超纯水冲洗过的细胞刮刮净培养皿中的液体并收集后离心,提取细胞中的总蛋白后检测其浓度。制备 SDS-PAGE 胶后,取 40 μ g 的蛋白样品在 SDS-PAGE 胶中进行电泳分离,将蛋白转膜至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 45 ~ 60 min,根据说明书加入稀释后的一抗,4 °C 孵育过夜,使用 PBST 浸洗 3 次后,加入稀释过的辣根过氧化物酶(HRP)标记过的兔二抗,室温下孵育 1 h 后取出 PVDF 膜, PBST 浸洗 3 次,加入显色剂于暗室下曝光摄片并保存,用以检测蛋白表达量。

1.6 MTT 实验 结肠癌细胞转染 siRNA 后 48 h,胰酶消化细胞后进行计数,以每孔 1 000 个细胞的密度于 96 孔板种板,每组设置 6 个复孔,分别于种板后的第 1 天、第 3 天、第 5 天进行数据收集,数据收集前,每孔加入 MTT 试剂 100 μ l,孵育 90 min 后,数据收集 570 nm 波长的吸光度值。

1.7 克隆形成实验 细胞转染 siRNA 后 48 h,胰酶消化细胞后进行计数,以每孔 1 000 个细胞的密度于 6 孔板种板,每组设置 3 个复孔,在保证细胞生长所需的营养足够的前提下,每隔 5 d 更换 1 次培养基,连续培养 14 d,待克隆形成后,弃去培养基, PBS 小心冲洗以去除悬浮细胞碎片及残留培养基

后,用 90% 乙醇固定,0.5% 结晶紫染色后,拍照并计数每组克隆形成数。

1.8 Transwell 实验

1.8.1 迁移实验 结肠癌细胞转染 siRNA 后 48 h,胰酶消化细胞后进行计数,用无血清培养基稀释细胞密度至 5×10^5 /ml,于 24 孔板 Transwell 小室下室加入 600 μ l 完全培养基(含 10% 胎牛血清),上室加入 200 μ l 细胞悬液,每组设置 3 个复孔,放入培养箱培养 24 h 后,90% 乙醇固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 10 min,显微镜下拍照并计数迁移细胞数。

1.8.2 侵袭实验 按照 1:8 的比例预先配置基质胶与无血清培养基的基质胶工作混合液,使用移液枪吸取 60 μ l 基质胶工作液于小室上层后,将 24 孔板放入细胞培养箱 2 h 以上,按照相同的步骤将用于侵袭实验的细胞悬液种植与小室上层,余步骤与迁移实验相同。

1.9 细胞划痕实验 结肠癌细胞转染 siRNA 后 48 h,胰酶消化细胞后重新将细胞种板在 6 孔板中,保证第 2 天细胞密度达到 90% 以上,第 2 天换低浓度血清培养基,在孔中用 10 μ l 枪头进行划“十”字痕,使用 PBS 溶液对漂浮细胞进行冲洗 2 遍后对划痕进行拍照,加入低浓度血清培养基后放入培养箱继续培养,24 h 后再次对划痕进行拍照,比较 0 h 和 24 h 划痕宽度的变化,并对不同处理组的划痕宽度进行统计分析,计算划痕愈合率。

1.10 TIMER 2.0 数据库 通过 TIMER 2.0 数据库(<http://timer.cistrome.org/>)在线分析 COAD 组

织中 *ROR γ* 基因的表达水平与免疫细胞浸润水平的关系。

1.11 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *ROR γ* 敲减细胞模型的构建 RT-qPCR 结果显示(图 1A):在 mRNA 水平上,敲低组 si-*ROR γ* -1、si-*ROR γ* -2 较对照组 si-NC 的 *ROR γ* 表达量下降($F = 444.30, P < 0.01$);对 *ROR γ* 的敲低效率超过 50%,表明敲减模型构建成功。Western blot 结果显示(图 1B):结肠癌细胞转染 siRNA 48 h 后,敲低组 (si-*ROR γ* -1、si-*ROR γ* -2) 较对照组的 *ROR γ* 蛋白表达水平明显下降,从蛋白水平上进一步表明 *ROR γ* 敲减细胞系构建成功。

2.2 下调 *ROR γ* 对结肠癌细胞增殖的影响 MTT 实验结果显示(图 1C):检测第 5 天细胞的吸光度值,与对照组比较,*ROR γ* 敲低组 (si-*ROR γ* -1、si-*ROR γ* -2) 的吸光度值明显增大(F 值 = 157.40, $P < 0.01$),提示 *ROR γ* 基因的表达下调可提高结肠癌细胞的增殖能力。克隆形成实验结果显示(图 1D):*ROR γ* 敲低组 (si-*ROR γ* -1、si-*ROR γ* -2) 细胞形成克隆数明显较对照组增多,差异有统计学意义($F = 61.35, P < 0.01$),提示 *ROR γ* 的低表达显著增强结肠癌细胞的克隆形成能力。

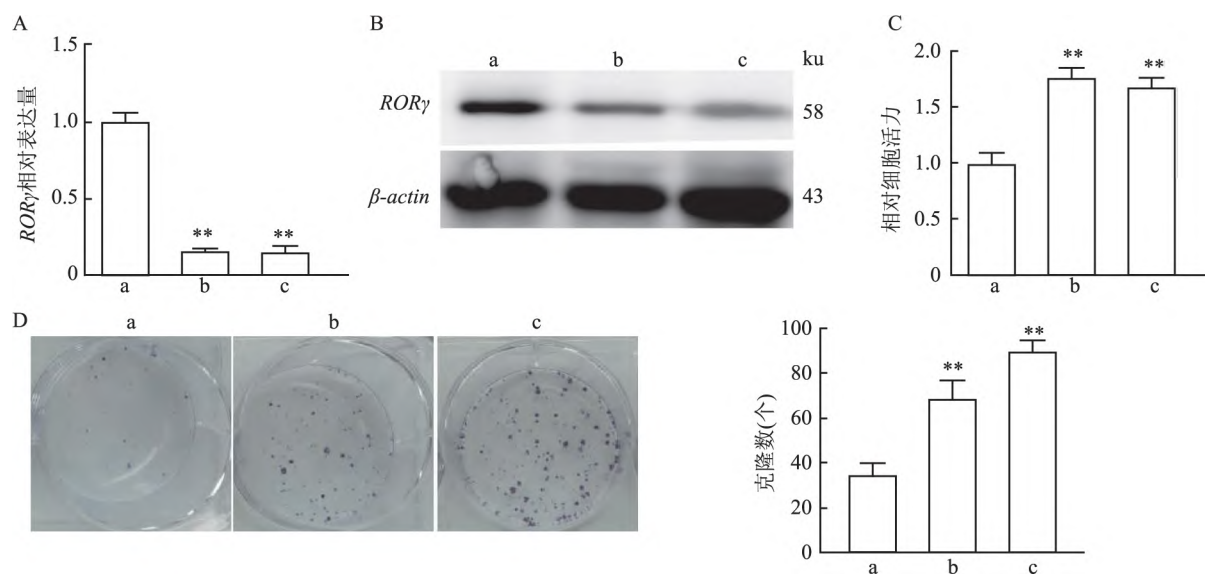


图1 *ROR γ* 对结肠癌细胞增殖的影响

A: RT-qPCR 结果直方图; B: Western blot 检测 *ROR γ* 蛋白水平; C: MTT 检测第 5 天细胞的吸光度值; D: 克隆形成实验克隆细胞图及细胞克隆数直方图统计分析; a: si-NC 组; b: si-*ROR γ* -1 组; c: si-*ROR γ* -2 组; 与 si-NC 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 下调 $ROR\gamma$ 对结肠癌细胞 SW480 迁移、侵袭的影响 Transwell 实验结果显示(图 2A): si- $ROR\gamma$ -1、si- $ROR\gamma$ -2 组较 si-NC 组的迁移($F = 13.00, P < 0.01$)及侵袭($F = 21.26, P < 0.01$)细胞数明显增多,差异有统计学意义。细胞划痕实验结果显示(图 2B): si- $ROR\gamma$ -1、si- $ROR\gamma$ -2 组细胞划痕愈合较 si-NC 组明显增快($F = 877.2, P < 0.01$)。

2.4 敲减 $ROR\gamma$ 对 EMT 相关蛋白表达的影响 Western blot 实验结果显示(图 3): $ROR\gamma$ 低表达后,上皮型钙黏附蛋白(E-Cadherin)表达下降,波形蛋白(vimentin)和神经型钙黏附蛋白(N-Cadherin)表达水平均明显升高。

2.5 $ROR\gamma$ 的表达水平与免疫细胞浸润的关系 TIMER 2.0 数据库在线分析结果显示(图 4):在 COAD 微环境中, $ROR\gamma$ 的 mRNA 水平与 M1 型巨噬细胞($Rho = -0.206, P = 5.83e-04$)、M2 型巨噬细胞($Rho = -0.168, P = 5.34e-03$)、活化的自然杀伤细胞($Rho = -0.138, P = 2.21e-02$)、静息的自然杀

伤细胞($Rho = 0.16, P = 7.84e-03$)、滤泡辅助性 T 细胞($Rho = -0.181, P = 2.62e-03$)、静息 $CD4^+$ 记忆 T 细胞($Rho = 0.198, P = 9.49e-04$)和调节性 T 细胞($Rho = 0.172, P = 4.25e-03$)浸润相关。

3 讨论

结肠癌作为威胁人类健康的恶性肿瘤之一,具有较高的发病率。近些年,随着人口老龄化和不良生活习惯等因素的影响,结肠癌的发病率仍处于上升阶段^[8]。目前关于结肠癌的治疗主要以手术、放化疗及靶向治疗为主,然而肿瘤的复发、转移及耐药对晚期癌症患者仍是亟需克服的难题^[7-9]。因此,寻找有效的治疗靶点对结肠癌的治疗至关重要。

$ROR\gamma$ 作为 ROR 家族成员之一,具有两种亚型,包括 $ROR\gamma1$ 和 $ROR\gamma2$ ($ROR\gamma t$),在代谢、免疫和癌症等多种生物学过程中发挥重要作用^[8]。近些年,多篇研究报道 $ROR\gamma$ 在癌症中扮演着癌基因的角色,其中包括肝癌^[10]、肺癌^[11]、前列腺癌^[12]、

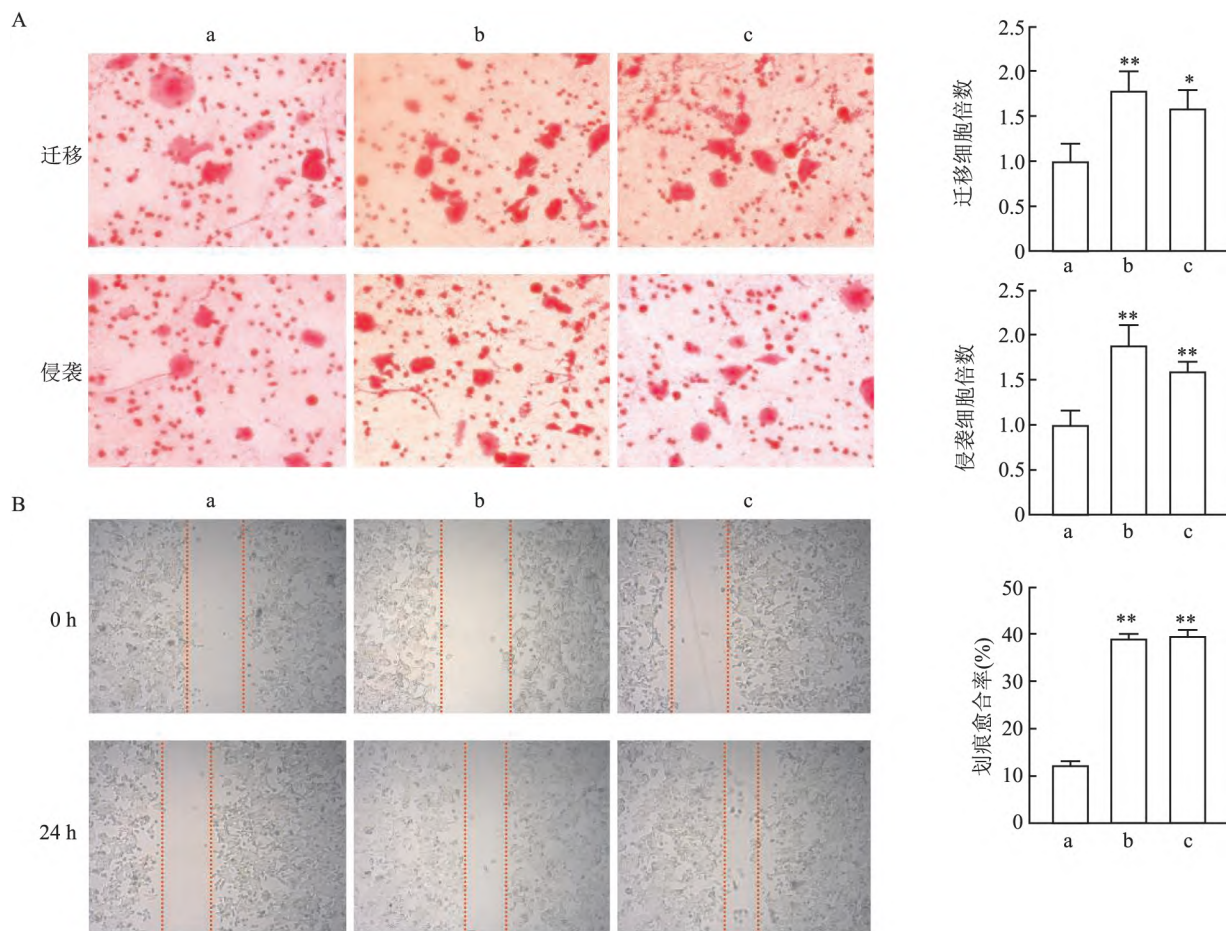


图2 $ROR\gamma$ 对结肠癌细胞 SW480 迁移、侵袭的影响

A: 迁移和侵袭实验检测细胞的迁移、侵袭能力 $\times 100$; B: 细胞划痕实验检测细胞划痕愈合能力 $\times 40$; a: si-NC 组; b: si- $ROR\gamma$ -1 组; c: si- $ROR\gamma$ -2 组; 与 si-NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

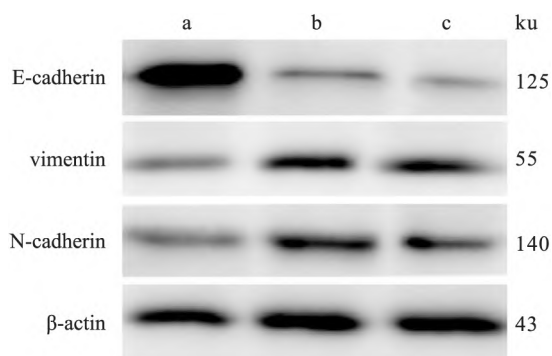


图3 干扰 $ROR\gamma$ 后对结肠癌细胞中 E-Cadherin、vimentin 和 N-Cadherin 蛋白表达水平的影响
a: si-NC 组; b: si- $ROR\gamma$ -1 组; c: si- $ROR\gamma$ -2 组

胃癌^[12]等。然而,也有报道^[13]提示 $ROR\gamma$ 在乳腺癌中发挥抑癌作用。由此可见, $ROR\gamma$ 可能由于基因的多功能性导致其针对不同肿瘤发挥相反的作用。

本研究中, $ROR\gamma$ 低表达后,通过 MTT 和克隆形成实验表明 $ROR\gamma$ 的敲低对结肠癌细胞的活力和增殖能力具有明显促进作用,此外,通过细胞划痕和 Transwell 实验表明 $ROR\gamma$ 的敲低对结肠癌细胞的迁移能力也具有显著的促进作用。因此,本研究表明 $ROR\gamma$ 对结肠癌细胞的增殖、转移具有抑制作用。EMT 是肿瘤转移所必需的重要阶段之一,而 E-cadherin 是上皮组织中细胞-细胞黏附连接的主要中介物^[14]。研究^[14]表明,抑制 E-cadherin 可导致上皮细胞间的黏附连接下降,并获得间充质细胞表型,

EMT 被激活,间充质细胞相关标志物 vimentin 和 N-Cadherin 表达增加,进而促进肿瘤细胞侵袭和转移。为了探究 $ROR\gamma$ 调控结肠癌细胞转移的潜在机制,本研究通过 Western blot 实验检测了 $ROR\gamma$ 对 EMT 相关蛋白影响。实验结果表明,当敲低 $ROR\gamma$ 表达后,E-Cadherin 表达下降,vimentin 和 N-Cadherin 表达水平明显升高,这表明 $ROR\gamma$ 可能通过影响 EMT 过程进而调控结肠癌细胞的迁移。有研究^[14]表明,在肿瘤间充质中浸润的免疫细胞可与邻近的癌细胞相互作用,诱导 EMT 的发生,促进肿瘤转移。此外,作为 $ROR\gamma$ 的亚型之一的 $ROR\gamma_t$,在辅助性 T 细胞 17(Th17) 的分化、先天淋巴样细胞(如 ILC3)发育和 $\gamma\delta$ T 细胞的功能中发挥关键作用^[15],因此猜测 $ROR\gamma$ 在结肠癌中的作用可能与免疫细胞浸润有关。为了探究这个猜想,本研究通过 TIMER 2.0 数据库在线分析了 $ROR\gamma$ 的表达与免疫细胞浸润的关系。在线分析结果提示,在 COAD 微环境中, $ROR\gamma$ 的 mRNA 表达水平与多种免疫细胞的浸润水平具有显著的相关性,由此可以认为 $ROR\gamma$ 对结肠癌的抑制作用有可能与免疫细胞浸润有关。

综上所述, $ROR\gamma$ 的下调可促进结肠癌细胞的增殖、迁移及 EMT, $ROR\gamma$ 在结肠癌中发挥抑癌作用的机制之一可能与免疫细胞浸润有关。推测 $ROR\gamma$ 有望成为结肠癌诊断、靶向治疗及预后预测的生物标志物。

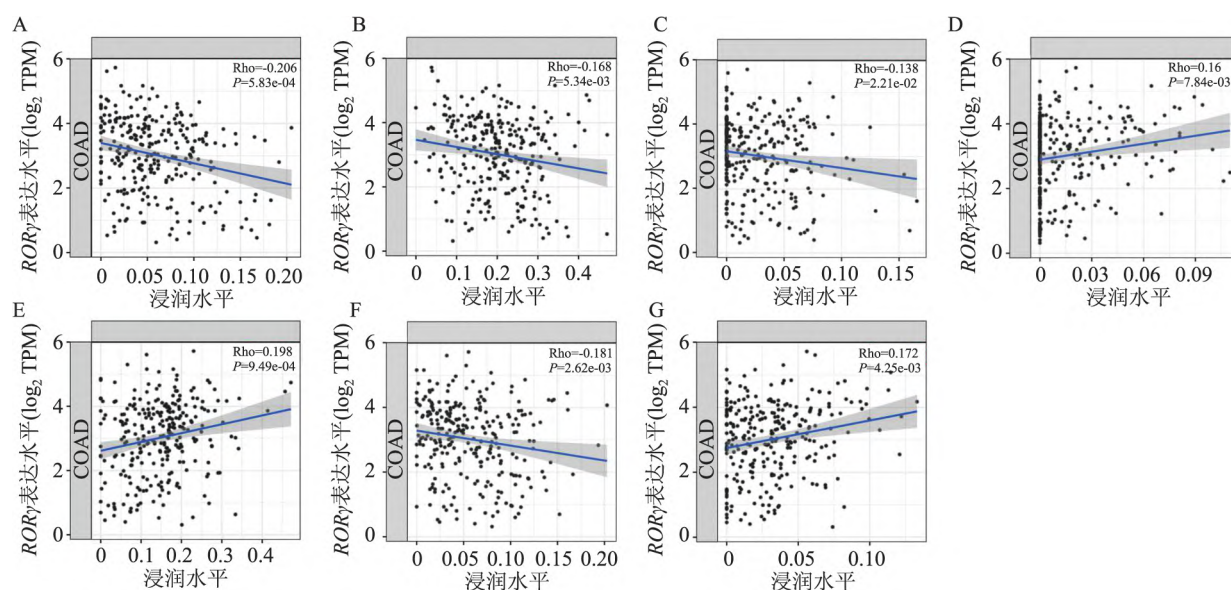


图4 $ROR\gamma$ 的表达水平与免疫细胞浸润的关系

A: 与 M1 型巨噬细胞浸润水平的关系; B: 与 M2 型巨噬细胞浸润水平的关系; C: 与活化的自然杀伤细胞浸润水平的关系; D: 与静息的自然杀伤细胞浸润水平的关系; E: 与静息 CD4⁺ 记忆 T 细胞浸润水平的关系; F: 与滤泡辅助性 T 细胞浸润水平的关系; G: 与调节性 T 细胞浸润水平的关系

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):209–49.
- [2] Zou H, Yang N, Zhang X, et al. *RORγ* is a context-specific master regulator of cholesterol biosynthesis and an emerging therapeutic target in cancer and autoimmune diseases [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022,196:114725.
- [3] Huang Y, Liang H, He C, et al. Hepatitis B virus X protein-induced *RORγ* expression to promote the migration and proliferation of hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2019,2019:5407126.
- [4] Oh T G, Wang S M, Acharya B R, et al. The nuclear receptor, *RORγ*, regulates pathways necessary for breast cancer metastasis [J]. *EBioMedicine*, 2016,6:59–72.
- [5] Pan X, Li B, Zhang G, et al. Identification of *RORγ* as a favorable biomarker for colon cancer [J]. *J Int Med Res*, 2021,49(5):3000605211008338.
- [6] Wu H, Liu J, Yin Y, et al. Therapeutic opportunities in colorectal cancer: focus on melatonin antioncogenic action [J]. *Biomed Res Int*, 2019,2019:9740568.
- [7] Jalilzadeh N, Samadi N, Salehi R, et al. Novel nano-vehicle for delivery and efficiency of anticancer auraptene against colon cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2020,10(1):1606.
- [8] Jiang W, Yan Y, Chen M, et al. Aspirin enhances the sensitivity of colon cancer cells to cisplatin by abrogating the binding of NF- κ B to the COX-2 promoter [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020,12(1):611–27.
- [9] Pothuraju R, Rachagani S, Krishn S R, et al. Molecular implications of MUC5AC-CD44 axis in colorectal cancer progression and chemoresistance [J]. *Mol Cancer*, 2020,19(1):37.
- [10] Huang Q, Fan J, Qian X, et al. Retinoic acid-related orphan receptor C isoform 2 expression and its prognostic significance for non-small cell lung cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016,142(1):263–72.
- [11] Wang Y, Huang Z, Chen C Z, et al. Therapeutic targeting of MDR1 expression by *RORγ* antagonists resensitizes cross-resistant CRPC to taxane *via* coordinated induction of cell death programs [J]. *Mol Cancer Ther*, 2020,19(2):364–74.
- [12] Wang R, Liu H, Xu L, et al. Melatonin downregulates nuclear receptor RZR/*RORγ* expression causing growth-inhibitory and anti-angiogenesis activity in human gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Lett*, 2016,12(2):897–903.
- [13] Lee B P, Pilling L C, Emond F, et al. Changes in the expression of splicing factor transcripts and variations in alternative splicing are associated with lifespan in mice and humans [J]. *Aging Cell*, 2016,15(5):903–13.
- [14] Dongre A, Weinberg R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019,20(2):69–84.

Effect of *RORγ* gene on proliferation and migration of colon cancer cells

Fang Changyi¹, Pan Xiaofei², Yu Changjun¹, Wu Ping², Chen Benxin², Li Bao², Zhang Gan², Gong Yuyong², Li Yang²

(¹Dept of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Ward 3, Dept of General Surgery, Affiliated Hospital of West Anhui Health Vocational College, Lu'an 237000)

Abstract *Objective* To investigate the effects of retinoid-related orphan receptor γ (*RORγ*) gene on proliferation and metastasis of human colon cancer cells. *Methods* *RORγ* knockdown cell lines were constructed and the knockdown efficiency was detected by RT-qPCR and Western blot assays; MTT, colony formation, Transwell and wound healing assays were used to detect cell proliferation and metastasis; the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins was detected by Western blot. The relationship between *RORγ* gene expression and immune cell infiltration in tumor microenvironment was analyzed using TIMER 2.0 database. *Results* The knockdown of *RORγ* enhanced the viability ($F = 157.40, P < 0.01$), clonogenesis ($F = 61.35, P < 0.01$), migration ($F = 13.00, P < 0.01$), invasion ($F = 21.26, P < 0.01$) and wound healing ability ($F = 877.2, P < 0.01$) of colon cancer cells, inhibited the expression of E-Cadherin, and promoted the expression of vimentin and N-Cadherin. TIMER 2.0 database analysis showed that *RORγ* expression in colon adenocarcinoma (COAD) tissues was associated with multiple immune cell infiltrates. *Conclusion* Downregulation of *RORγ* expression promoted the proliferation and metastasis of colon cancer cells.

Key words colon cancer; retinoid-related orphan receptor γ ; immune infiltration; proliferation; migration