

网络出版时间: 2020-4-7 16:48 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200403.1821.009.html>

miR-486-5p 靶向 FOXO1 抑制结肠癌干细胞干性的初步研究

龚立刚¹, 艾成思², 王梦萍¹

摘要 目的 研究 miR-486-5p 在结肠癌 (CRC) 细胞系和 CRC 干细胞 (CSCs) 中的表达水平,并探讨 miR-486-5p 对 CRC CSCs 干性的影响和对 FOXO1 的靶向调控作用。方法 qRT-PCR 检测 miR-486-5p 在 CRC 细胞系 SW480、HCT116、SW620 和 HT29 及正常结肠细胞系 NCM460 中的表达水平。培养 HCT116 细胞中的 CSCs。Western blot 检测 Nanog、SOX2、OCT4 干性标志蛋白及 miR-486-5p 在 CSCs 中的表达。经脂质体分别转染 miR-486-5p mimic 和对照 (NC) 48 h 后,MTS 检测 CSCs 增殖能力,Transwell 实验检测 CSCs 转移能力,Boyden 实验检测 CSCs 侵袭能力。遗传霉素 (G418) 筛选稳定过表达 miR-486-5p 的 CSCs 细胞,注射到 BALB/c 裸鼠皮下,观察 miR-486-5p 对 CSCs 体内致瘤能力的影响。经 Targetscan 7.1 软件预测及双荧光素酶报道基因实验验证 miR-486-5p 对 FOXO1 基因的靶向作用,qRT-PCR 检测 miR-486-5p 对 CSCs 中 FOXO1 mRNA 表达影响。结果 qRT-PCR 结果显示 miR-486-5p 在 CRC 细胞系中的表达低于正常结肠细胞系 (均 $P < 0.05$)。OCT4、Nanog、SOX2 干细胞标志物在 CSCs 中表达上调;miR-486-5p 在 CSCs 中表达显

著下降;miR-486-5p mimic 后,CSCs 细胞增殖、转移及侵袭能力均下降 (均 $P < 0.05$)。CSCs_{miR-486-5p} 裸鼠成瘤能力降低 ($P < 0.05$)。TargetScan7.1 预测软件和双荧光素酶报道基因实验证实 FOXO1 为 miR-486-5p 的靶基因,miR-486-5p mimic 组 FOXO1 mRNA 的表达减少 ($P < 0.05$)。结论 miR-486-5p 在 CRC 细胞系和 CSCs 中均低表达,miR-486-5p 能通过负调控 FOXO1 抑制 CSCs 的干性。

关键词 结肠癌; CSCs; miR-486-5p; FOXO1; 干性

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)04-0528-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.009

结肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是常见的消化系统恶性肿瘤,在世界肿瘤相关死亡中位居第四位^[1]。虽然 CRC 的手术治疗和化疗在过去几年取得了较大的进展,但 CRC 患者的预后较差,5 年生存率仅为 50%~65%^[2]。CRC 是较为复杂的疾病,以腺瘤开始在慢性炎症和持续感染等因素作用下经过上皮细胞和癌前细胞突变的累积演变而来,但其发生发展的具体作用机制尚未明确^[3]。同时 CRC 的重要特征为淋巴细胞浸润和转移,而转移导致的治疗困难是 CRC 患者死亡的重要原因^[4]。因此,寻找 CRC 恶性进展过程中发挥关键作用的调控因子,

2019-11-27 接收

基金项目: 湖北省卫生和计划生育委员会科研项目 (编号: MJ2017Y065)

作者单位: 武汉市第八医院¹ 病理科、² 检验科 武汉 430010

作者信息: 龚立刚,男,主治医师,责任作者,E-mail: gan20140204@126.com

Methods Western blot and qRT-PCR were used to detect MAST3 expression in gastric cancer tissues. MAST3-RNAi and pEx-3-MAST3 were further transfected into SGC-7901 cells, and the expressions of CyclinD1, C-myc, MMP9 and MMP3 were detected by qRT-PCR and Western blot, respectively, and the effect of MAST3 on the proliferation and migration of SGC-7901 cells was observed. Cell cycle was detected by flow cytometry. **Results** Western blot results showed that MAST3 was significantly higher in gastric cancer tissues than that in adjacent tissues ($P < 0.01$), and the expression increased significantly after TGF- β 1 stimulation. After MAST3-RNAi inhibited the expression of MAST3, the expression of CyclinD1 and C-myc protein was significantly lower than that of the control group ($P < 0.01$), and the cells in S phase and G₂/M phase significantly decreased, while the expression of MMP-9 and MMP-3 protein was also significantly lower than that of the control. The expression of CyclinD1 and C-myc protein was significantly higher than that of the control group after pEx-3-MAST3 over-expression of MAST3 ($P < 0.01$), and the cells in S phase and G₂/M phase significantly increased, MMP-9 and MMP-3 protein expression was also significantly higher than of the control group. **Conclusion** MAST3 can regulate the proliferation and migration of gastric cancer SGC-7901 cells.

Key words MAST3; SGC-7901 cells; proliferation; migration

抑制其恶性生物学行为有助于改善患者预后。miRNAs 是一类非编码小 RNA, 在肿瘤中表达异常, 参与肿瘤的增殖、侵袭和转移等过程, 广泛调控肿瘤细胞的恶性行为^[5-6]。而肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是肿瘤发生、复发、转移和耐药的主要原因^[7], 而 miRNAs 在调控 CSCs 中的重要作用已经在多种肿瘤中被证实^[8]。miR-486-5p 是目前研究较为成熟的 miRNAs 之一, 在多种肿瘤中表达异常, 其在 CRC 中低表达, 并靶向多形性腺瘤基因 1 样锌指 2(pleomorphic adenoma gene 1 like zinc finger 2, PLAGL2) 参与致癌作用^[9-10]。但 miR-486-5p 是否调控 CRC CSCs 未见有文献报道, 故该文旨在研究 miR-486-5p 与 CRC CSCs 的调控作用及初步作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 TRIzol、反转录和 qRT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; CRC 细胞系和正常结肠细胞系 NCM460 购自美国 ATCC 细胞库; 细胞培养基及 FBS 购自美国 Gibco 公司; miR-486-5p mimic、突变型和野生型对叉头盒 O1(forkhead box class O1, FOXO1) 的 3'-非翻译区(3'-UTR) 荧光素酶报告载体(FOXO1-wt、FOXO1-mut) 及 miR-486-5p 过表达质粒购自上海生工公司; MTS 购自美国 Promega 公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; Nanog、SOX2、OCT4、GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司; 裸鼠购自北京维通利华实验技术有限公司。

1.2 qRT-PCR TRIzol 裂解液提取细胞总 RNA。设计合成 miR-486-5p 引物 F: 5'-ACACTCCAGCTGGGTCCTGTACTGAGCTGCCC-3', R: 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCCCCGA-3', 以总 RNA 逆转的 cDNA 作为模板按照说明书进行 qRT-PCR。分析各样品的循环阈值(threshold cycle, Ct), 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各组实验数据。

1.3 细胞培养与转染 DMEM 高糖 + 10% FBS 培养 SW480、SW620 和 HT29 细胞, McCoy's 5A + 10% FBS 培养 HCT116 细胞, RPMI-1640 + 10% FBS 培养 NCM460 细胞。将 HCT116 细胞无血清培养出的肿瘤球制成单个细胞后依次与小鼠抗人 CD133 抗体、小鼠抗人 CD44 抗体包被的磁珠孵育, 分选出 CD133/CD44 双阳性的细胞, 无血清培养基中继续培养。流式细胞仪检测 CSCs 中 CD133/CD44 双阳性细胞率。CSCs 铺至 6 孔板中, 按说明书将对照组(NC) 和 miR-486-5p mimic 转染试剂与脂质体 2000

混合后转染至 CSCs 中, 放至培养箱中培养。

1.4 MTS 实验 收集转染 48 h 的各组细胞, 以每组每孔 2×10^3 个细胞接种于 96 孔板中培养, 共铺 0、24、48 和 72 h 的细胞量, 组内设置 6 个复孔, 在相应的时间每孔加入 30 μ l MTS 试剂, 并在 37℃ 细胞培养箱中孵育 2 h, 酶标仪 490 nm 处检测各孔的吸光度(optical density, OD) 值。

1.5 Transwell 小室法检测细胞转移能力 收集转染 48 h 后的各组细胞无血清培养基洗 3 次, 以每孔 1×10^5 个细胞、100 μ l 无血清培养基接种于 Transwell 小室中, 500 μ l 的完全培养基加入下室, 放至培养箱中培养, 10 h 终止培养, 甲醛固定 5 min, 苏木精染色。显微镜下随机计数 5 个视野膜上的细胞数目。

1.6 Boyden 法检测细胞侵袭能力 收集转染 48 h 后的各组细胞无血清培养基洗 3 次, 以每孔 1×10^5 个细胞、100 μ l 无血清培养基接种于 Boyden 上, 其他步骤同 Transwell 小室实验。

1.7 裸鼠移植瘤模型的构建 miR-486-5p 过表达质粒及其对照质粒 vector, 与脂质体 2000 混合后转染 CSCs 96 h 后更换含 1.0 μ g/ml 遗传霉素(geneticin, G418) 的新鲜培养基筛选稳定表达的细胞, 隔天更换 1 次, 直至所有细胞均可观察到荧光。将筛选的稳转细胞株 CSCs_{miR-486-5p} 和 CSCs_{vector} 以 6×10^7 个/ml 分别注射到 4 周龄左右的裸鼠右侧腋下。每 4 d 测量 1 次瘤子的体积, 4 周后处死裸鼠, 该实验的所有操作均符合动物伦理学。

1.8 miR-486-5p 靶基因的验证 TargetScan 7.1 软件(<http://www.targetscan.org/>) 预测 miR-486-5p 的靶基因。双荧光素酶报道基因实验分别将以下 4 组共转染到 CSCs 中: FOXO1-wt 与 miR-486-5p mimics 共转染组(FOXO1-wt + miR-486-5p); FOXO1-wt 与 NC 共转染组(FOXO1-wt + NC); FOXO1-mut 与 miR-486-5p mimics 共转染组(FOXO1-mut + miR-486-5p); FOXO1-mut 与 NC 共转染组(FOXO1-mut + NC), 收集转染 48 h 的各组细胞, 根据双荧光素酶报道基因检测说明书检测各组荧光素酶活性。

1.9 Western blot 检测蛋白表达 各组细胞加入 RIPA 冰上裂解 10 min 后, 超声仪裂解 30 min 后离心。将上清液移至新的 EP 管中, BCA 液检测蛋白浓度后煮沸变性, 50 μ g 蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳分离, 湿转 8% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, Nanog、SOX2、OCT4、GAPDH(稀释浓度为 1:1 000) 一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 次后, 室温孵育兔二抗(稀释

浓度为 1 : 8 000) 1 h , 采用 ECL 化学发光法曝光条带。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析 , 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示 , 采用独立 t 检验比较两组间的差异 , 多组均数比较采用方差分析 , $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测 miR-486-5p 在 CRC 细胞系中的表达 qRT-PCR 检测 miR-486-5p 在 CRC 细胞系 SW480、HCT116、SW620 和 HT29 中的表达分别为 0.45 ± 0.08 、 0.67 ± 0.09 、 0.38 ± 0.10 、 0.81 ± 0.13 , 在正常结肠细胞系 NCM460 中的表达为 1.01 ± 0.04 , miR-486-5p 在 CRC 细胞系中的表达低于正常 CRC 细胞系中的表达 ($F = 15.43$, $t = 0.036$) 。见图 1。

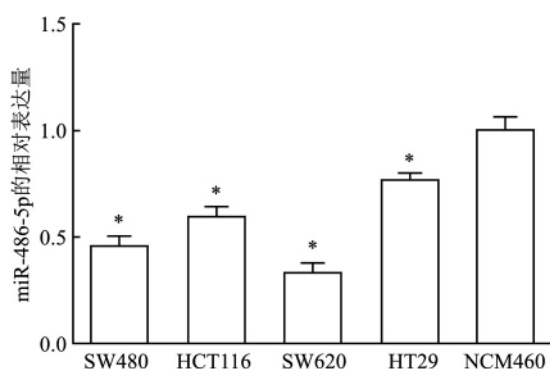


图1 miR-486-5p 在 CRC 细胞系中的表达
与 NCM460 比较: * $P < 0.05$

2.2 CRC CSCs 的分选与鉴定 利用抗体包被的磁珠从 HCT116 细胞培养的肿瘤球中(图 2A)分选出 CD133/CD44 双阳性的细胞(图 2B) , 扩大培养后流式细胞仪检测 CD133/CD44 双阳性细胞为 94.06% , Western blot 检测 Nanog、OCT4 和 SOX2 干性标志蛋白在 CD133/CD44 双阳性细胞中的表达高于在 CD133/CD44 非双阳性细胞中的表达(图 2C)。

2.3 miR-486-5p 在 CRC CSCs 中的表达 qRT-PCR 结果显示 miR-486-5p 在 CSCs(CD133/CD44 双阳性) 中的表达为 0.31 ± 0.06 低于在 HCT116 (CD133/CD44 非双阳性) 中的表达 1.01 ± 0.04 。 miR-486-5p mimic 转染 CSCs , qRT-PCR 检测显示 miR-486-5p mimic 组中 miR-486-5p 的表达 (9.36 ± 1.15) 高于 NC 组 (1.05 ± 0.05) , 均 $P < 0.05$ (图 3)。

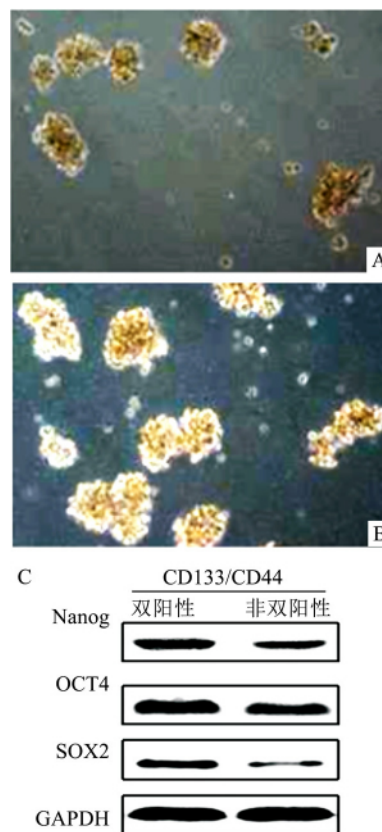


图2 CRC CSCs 的分选与鉴定

A: 无血清培养的 HCT116 细胞肿瘤球 $\times 100$; B: 磁珠分选出的 HCT116 细胞肿瘤球 $\times 100$; C: Nanog、OCT4 和 SOX2 干性标志蛋白在 CD133/CD44 双阳性细胞中的表达

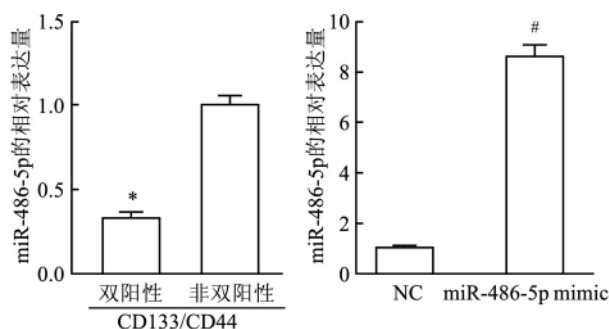


图3 qRT-PCR 检测 miR-486-5p 在 CRC CSCs 中的表达水平
与 CD133/CD44 非双阳性细胞比较: * $P < 0.05$; 与 NC 组比较 ,
$P < 0.05$

2.4 MTS 检测 miR-486-5p 过表达对 CSCs 增殖的影响 采用 MTS 法研究 miR-486-5p 对 CSCs 细胞增殖能力的影响 , 与 NC 组相比 , miR-486-5p mimic 组细胞增殖能力减慢 ($P < 0.05$, 图 4)。

2.5 Transwell 小室检测 miR-486-5p 过表达对 CSCs 转移能力的影响 采用 Transwell 小室研究 miR-486-5p 对 CSCs 细胞转移能力的影响 , miR-

486-5p mimic 和 NC 组细胞穿膜数分别为 (110.01 ± 10.99) 、 (168.22 ± 15.37) 个。miR-486-5p mimic 组细胞转移能力低于 NC 组 ($P < 0.05$, 图 5)。

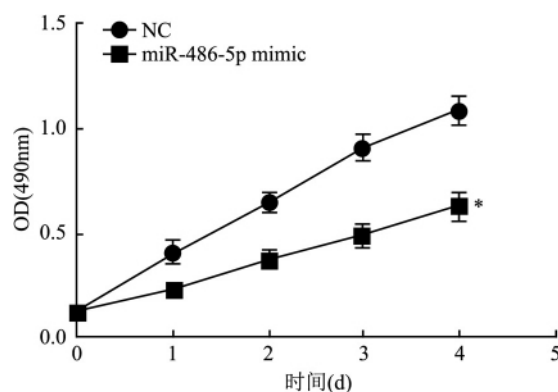


图 4 miR-486-5p 对 CRC CSCs 细胞增殖能力的影响
与 NC 组比较: * $P < 0.05$

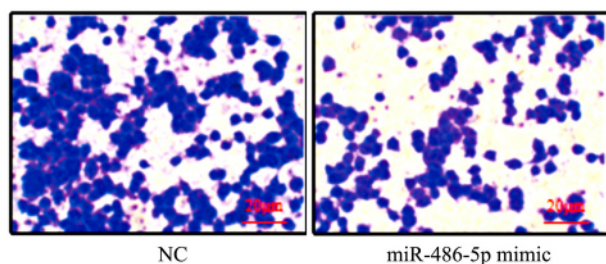


图 5 miR-486-5p 对 CRC CSCs 细胞转移能力的影响 $\times 100$

2.6 Boyden 检测 miR-486-5p 过表达对 CSCs 侵袭能力的影响 采用 Boyden 小室研究 miR-486-5p 对 CSCs 侵袭能力的影响。miR-486-5p mimic 和 NC 组细胞穿膜数分别为 (82.35 ± 14.67) 、 (138.68 ± 11.93) 个。miR-486-5p mimic 组细胞侵袭能力低于 NC 组 ($P < 0.05$, 图 6)。

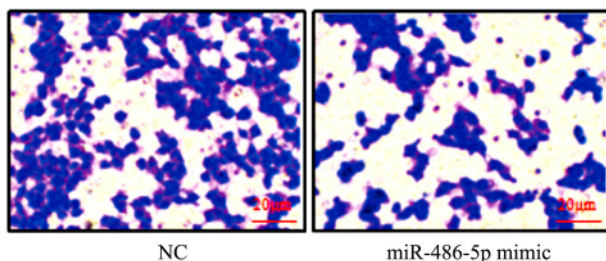


图 6 miR-486-5p 对 CRC CSCs 细胞侵袭能力的影响 $\times 100$

2.7 miR-486-5p 对 CSCs 体内致瘤能力的影响 将稳转细胞系 CSCs_{miR-486-5p} 和 CSCs_{vector} 注射到裸鼠右侧腋下, 观察皮下瘤体的生长速度, 每隔 3 d 测量 1 次成瘤体积, 绘制瘤体体积曲线。4 周左右时处死裸

鼠, 解剖出瘤体, 观察瘤体的大体观。结果显示: CSCs_{miR-486-5p} 组裸鼠体积显著低于 CSCs_{vector} 组 (图 7A、B), 差异有统计学意义。

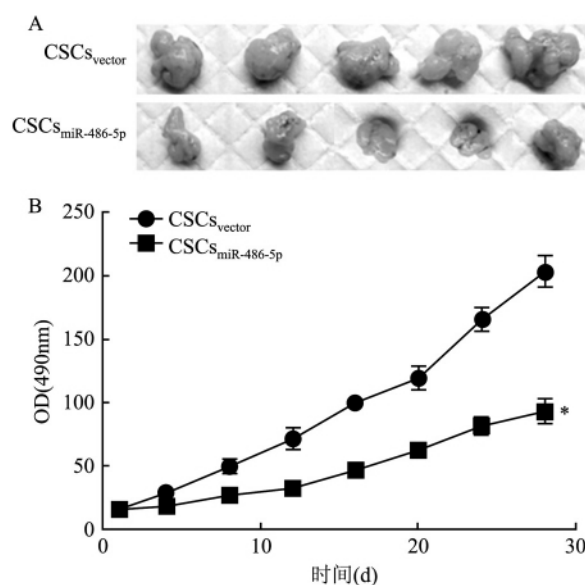


图 7 miR-486-5p 对 CRC CSCs 细胞体内致瘤性的影响

A: 裸鼠解剖瘤体大小; B: 裸鼠成瘤体积; 与 CSCs_{vector} 比较: * $P < 0.05$

2.8 miR-486-5p 对 FOXO1 的调控 TargetScan 7.1 软件在线预测显示 FOXO1 启动子区有 miR-486-5p 的结合位点 (图 8A)。进一步双荧光素酶报告基因实验显示: 与 FOXO1-wt + NC 共转染组相比, FOXO1-wt + miR-486-5p 共转染组的荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$); 而 FOXO1-mut + NC 和 FOXO1-mut + miR-486-5p 组之间的荧光素酶活性无显著差异 ($P > 0.05$, 图 8B)。qRT-PCR 结果显示, 与 NC 转染组比较, miR-486-5p mimic 组 CSCs 中 FOXO1 mRNA 表达水平下降 ($P < 0.05$, 图 8C)。

3 讨论

CRC 是世界范围内常见的恶性肿瘤, 肿瘤转移、复发及耐药导致患者的生存率不佳^[1-2], 虽然 CRC 的发病机制引起广大学者的关注, 但是具体的发病机制尚未明确, 因此从分子水平研究 CRC 的发生发展机制以寻找治疗 CRC 的候选靶点仍迫切需要。miRNAs 是非编码 RNA 家族中的小 RNA, 长度为 19 ~ 25 bp, 密切参与人类肿瘤的发生发展。研究^[6]发现 CRC 中存在 miRNAs 异常表达谱, miR-34a 在奥沙利铂耐药 CRC 患者组织中低表达, 外源性 miR-34a 的异位表达可使多药耐药的 CRC HCT-8/OR 细胞重新奥沙利铂的治疗增敏, 而 miR-34a 的

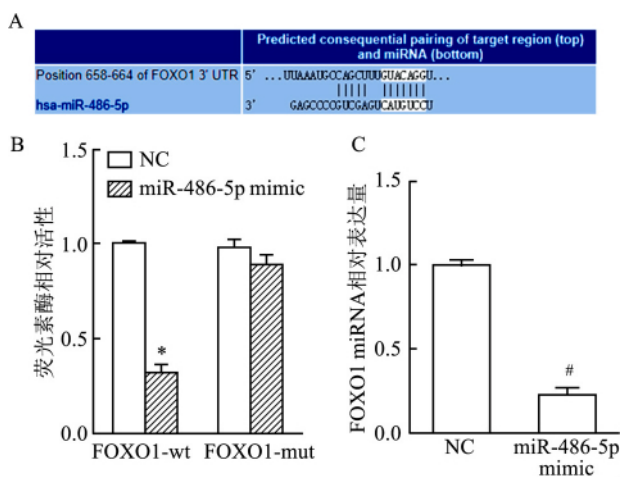


图8 miR-486-5p对FOXO1的调控作用

A: TargetScan 7.1 软件预测 FOXO1 与 miR-486-5p 的结合位点; B: 双荧光素酶报道基因试验检测 miR-486-5p 靶向 FOXO1; C: qRT-PCR 检测 FOXO1 mRNA 在 miR-486-5p mimic 组中的表达水平; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, # $P < 0.05$

抑制增强了 HCT-8 细胞对奥沙利铂的抗性,提示 miRNAs 具有作为药物靶点的潜能,为研究肿瘤治疗的热点。

CSCs 是可以从肿瘤组织和细胞中培养分离出的具有干细胞相似功能,即多能性和分化潜能的一类细胞^[7],CSCs 的分离和培养方法的日渐成熟,从 CSCs 的角度研究 CRC 新的治疗方法具有重大意义。CSCs 的恶性生物学行为即增殖、侵袭、转移和体内致瘤性等统称为 CSCs 的干性^[11],miRNAs 在调控 CSCs 干性方面的重要作用也逐步被证实。文献报道 miR-486-5p 在 CRC 中低表达,其中 Liu et al^[9] 研究发现 miR-486-5p 下降与 TNM 晚期、肿瘤大小、淋巴结转移和预后不良有关,上调 miR-486-5p 抑制 CRC 细胞增殖和迁移。Zhang et al^[10] 报道 miR-486-5p 通过靶向 PIK3R1 减少 AKT 信号通路的激活来抑制 CRC 的进展。miR-486-5p 在 CRC 中低表达是否调控 CRC CSCs 的干性未见有报道,Shaham et al^[12] 在儿童急性髓性白血病研究中发现 miR-486-5p 的异位表达可以增强原发性胎肝造血祖细胞的自我更新能力,提示 miR-486-5p 可能参与调控 CSCs 的干性。本研究显示 miR-486-5p 在 CRC 细胞系中的表达水平均低于正常细胞系中的表达水平,与已有的报道研究一致^[9-10],表明 miR-486-5p 在 CRC 中可能为抑癌因子。为研究 miR-486-5p 是否调控 CRC CSCs 的干性,首先培养 CRC CSCs,qRT-PCR 检测结果显示 miR-486-5p 在 CSCs 中的表达低于 CD133/CD44 非双阳性的细胞,而 miR-486-5p

mimic 转染 CSCs,MTS 增殖实验、Transwell、Boyden 和体内裸鼠成瘤实验结果显示 miR-486-5p 过表达后 CSCs 增殖、转移、侵袭和体内致瘤能力均下降。

已经观察到 miR-486-5p 过表达抑制 CRC CSCs 的干性,但是其具体的作用机制需进一步研究。miRNAs 通过与靶基因 mRNA 的 3' UTR 区结合在转录后水平负调控靶基因的表达。已经证实的 miR-486-5p 的 miR-486-5p 靶基因为 PLAGL2、PIK3R1 等基因^[9-10]。TargetScan7.1 预测软件预测 miR-486-5p 存在上百个靶基因,其中转录因子 FOXO1 属于叉头 O 家族蛋白,在多种肿瘤中表达异常,在 CRC 中表达增加为癌基因^[13]。而同时 FOXO1 与 CSCs 的调控具有密切关系,FOXO1 在乳腺癌中促进 CSCs 肿瘤球形成^[14];FOXO1 在人急性髓性白血病 CD34⁺ 细胞中的表达促进其自我更新能力,是激活干细胞分子特征所必须的,靶向 FOXO1 可能是在白血病前期和白血病期消除干细胞的潜在治疗策略^[15]。因此课题组设想 miR-486-5p 可能通过靶向抑制 FOXO1 的表达调控 CRC CSCs 的干性,对此采用双荧光素酶报道基因实验验证 miR-486-5p 是否直接靶向调控 FOXO1,结果证实 FOXO1 为 miR-486-5p 直接调控的靶基因。同时 CRC CSCs 转染 miR-486-5p mimic 后,qRT-PCR 结果显示 CSCs 中 FOXO1 mRNA 表达水平减少,表明 miR-486-5p 可能通过靶向负调控 FOXO1 抑制 CRC CSCs 的干性,但其深入的作用机制需在后续研究中进行探讨。

综上所述,miR-486-5p 低表达于 CRC 细胞系和 CSCs 中,在 CSCs 中过表达 miR-486-5p 显著抑制 CSCs 的增殖、转移、侵袭和体内致瘤能力,其初步机制可能是通过负调控 FOXO1 抑制 CSCs 的干性,miR-486-5p 可能为消除 CSCs 治疗 CRC 的潜在靶点。

参考文献

- [1] Takeda K, Mizushima T, Yokoyama Y, et al. Sox2 is associated with cancer stem-like properties in colorectal cancer[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 17639.
- [2] Brenner H, Kloor M, Pox C P. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2014, 383(9927): 1490-502.
- [3] Wang S, Miao Z, Yang Q, et al. The dynamic roles of mesenchymal stem cells in colon cancer[J]. Can J Gastroenterol Hepatol, 2018, 2018: 7628763.
- [4] Skancke M, Arnott S M, Amdur R L, et al. Lymphovascular invasion and perineural invasion negatively impact overall survival for stage II adenocarcinoma of the colon[J]. Dis Colon Rectum,

- 2019 ,62(2) : 181 – 8.
- [5] Wang C Z ,Deng F ,Li H ,et al. MiR-101: a potential therapeutic target of cancers[J]. *Am J Transl Res* ,2018 ,10(11) : 3310 – 21.
- [6] Li Y ,Gong P ,Hou J X ,et al. miR-34a regulates multidrug resistance via positively modulating OAZ2 signaling in colon cancer cells[J]. *J Immunol Res* ,2018 ,2018: 7498514.
- [7] Radpour R ,Forouharkhou F. Single-cell analysis of tumors: Creating new value for molecular biomarker discovery of cancer stem cells and tumor-infiltrating immune cells[J]. *World J Stem Cells* ,2018 ,10(11) : 160 – 71.
- [8] 徐小涛 ,吉婷婷. microRNAs 与肿瘤及肿瘤干细胞的研究进展[J]. *基础医学与临床* ,2018 ,38(9) : 1361 – 5.
- [9] Liu X ,Chen X ,Zeng K ,et al. DNA-methylation-mediated silencing of miR-486-5p promotes colorectal cancer proliferation and migration through activation of PLAGL2/IGF2/ β -catenin signal pathways[J]. *Cell Death Dis* ,2018 ,9(10) : 1037.
- [10] Zhang Y ,Fu J ,Zhang Z ,et al. miR-486-5p regulates the migration and invasion of colorectal cancer cells through targeting PIK3R1[J]. *Oncol Lett* ,2018 ,15(5) : 7243 – 8.
- [11] Liu M ,Tu J ,Gingold J A ,et al. Cancer in a dish: progress using stem cells as a platform for cancer research[J]. *Am J Cancer Res* ,2018 ,8(6) : 944 – 54.
- [12] Shaham L ,Vendramini E ,Ge Y ,et al. MicroRNA-486-5p is an erythroid oncomiR of the myeloid leukemias of down syndrome[J]. *Blood* ,2015 ,125(8) : 1292 – 301.
- [13] Hsu Y L ,Chen Y J ,Chang W A ,et al. Interaction between tumor-associated dendritic cells and colon cancer cells contributes to tumor progression via CXCL1 [J]. *Int J Mol Sci* ,2018 ,19(8) : E2427.
- [14] Truong T H ,Dwyer A R ,Diep C H ,et al. Phosphorylated progesterone receptor isoforms mediate opposing stem cell and proliferative breast cancer cell fates[J]. *Endocrinology* ,2019 ,160(2) : 430 – 46.
- [15] Lin S ,Ptasinska A ,Chen X ,et al. A FOXO1-induced oncogenic network defines the AML1-ETO preleukemic program[J]. *Blood* ,2017 ,130(10) : 1213 – 22.

Preliminary study of miR-486-5p targeting FOXO1 inhibiting stemness of colorectal cancer stem cell

Gong Ligang¹ ,Ai Chengsi² ,Wang Mengping¹

(¹Dept of Pathology ,²Clinical Laboratory ,Wuhan Eighth Hospital Hubei 430010)

Abstract Objective To study the expression levels of miR-486-5p in colorectal cancer (CRC) cell lines and CRC stem cells (CSCs) ,and to explore its effect on CRC CSCs stemness and the targeted regulation of miR-486-5p on Forkhead box class O1(FOXO1) . **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression levels of miR-486-5p in CRC cell lines SW480 ,HCT116 ,SW620 and HT29 and normal colon cell line NCM460. CSCs were cultured in HCT116 cells. Western blot was used to detect the expressions of Nanog ,SOX2 ,OCT4 stemness marker protein and miR-486-5p in CSCs. After transfected with miR-486-5p mimic and control (NC) 48 h ,MTS was used to detect the proliferation ability of CSCs ,Transwell assay was used to detect the metastasis ability of CSCs ,and Boyden assay was used to detect the invasive ability of CSCs. CSCs stably overexpressing miR-486-5p were screened by geneticin (G418) and injected into BALB/c nude mice to observe the effect of miR-486-5p on the tumorigenic ability of CSCs *in vivo*. The targeting effect of miR-486-5p on FoxO1 gene was verified by targets can 7.1 software prediction and double luciferase reporter gene test. qRT-PCR was used to detect the effect of miR-486-5p on FOXO1 mRNA expression in CSCs. **Results** qRT-PCR results showed that the expression of miR-486-5p in CRC cell lines was lower than that in normal colon cell line ($P < 0.05$) . The expressions of OCT4 ,Nanog and SOX2 stem cell markers were up-regulated in CSCs ,and the expression of miR-486-5p decreased in CSCs. The proliferation ,metastasis and invasion of CSCs decreased after miR-486-5p mimic transfected ($P < 0.05$) . The tumorigenic ability of CSC-s_{miR-486-5p} nude mice decreased ($P < 0.05$) . TargetScan7.1 prediction software and double luciferase reporter gene assay confirmed that FOXO1 was a target gene of miR-486-5p ,and the expression of FOXO1 mRNA in miR-486-5p mimic group decreased ($P < 0.05$) . **Conclusion** miR-486-5p has low expression in CRC cell lines and CSCs ,and miR-486-5p may inhibit the stemness of CSCs by negative regulation of FOXO1.

Key words colorectal cancer; CSCs; miR-486-5p; FOXO1; stemness