

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.01.006

· 基础研究 ·

## miR-502-3p 通过靶向 GTPBP2 基因调控结直肠癌干细胞增殖与凋亡

柯超, 周红见, 蒋斌, 谢兴旺, 张超(武汉市第三医院 胃肠腹壁与疝外科, 湖北 武汉 430061)

**[摘要]** **目的:** 探讨 miR-502-3p 通过靶向 GTP 结合蛋白 2(GTPBP2) 调控结直肠癌干细胞(CCSC)增殖、细胞周期和凋亡的分子机制。**方法:** 利用免疫磁珠分选技术从结直肠癌细胞 HCT116 中分选 CCSC(CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> 双阳性细胞和 CD133<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup> 双阴性细胞), 用 qPCR 法检测细胞中 miR-502-3p 表达水平。利用脂质体转染法分别将 miR-NC、miR-502-3p、si-miR-NC、si-miR-502-3p、miR-502-3p+vector 和 miR-502-3p+GTPBP2 转染至 CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> 细胞中, 记作 miR-NC、miR-502-3p、si-miR-NC、si-miR-502-3p、miR-502-3p+vector 和 miR-502-3p+GTPBP2 组。用 qPCR 法检测细胞中 miR-502-3p、GTPBP2 mRNA 表达水平, MTT 法、流式细胞术分别检测细胞增殖率、细胞周期和凋亡率, WB 法检测细胞中 Ki67、CDK1、Bcl2、BAX 和 GTPBP2 蛋白的表达水平。双荧光素酶报告基因实验验证 miR-502-3p 与 GTPBP2 基因的靶向关系。**结果:** CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> 细胞中 miR-502-3p 表达水平显著低于 CD133<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup> 细胞 ( $P < 0.01$ )。与 miR-NC 组比较, miR-502-3p 组细胞增殖率、S 期细胞比例显著降低 (均  $P < 0.01$ ), 凋亡率、G0/G1 期细胞比例显著升高 (均  $P < 0.01$ ), 细胞中 Ki67、CDK1、Bcl2 蛋白表达均显著下调 (均  $P < 0.01$ ), BAX 蛋白表达显著上调 ( $P < 0.01$ )。miR-502-3p 靶向调控 GTPBP2 的表达, 过表达 GTPBP2 可逆转上调 miR-502-3p 对 CCSC 增殖、周期和凋亡的作用。**结论:** 上调 miR-502-3p 表达抑制 CCSC 增殖和阻滞细胞周期, 诱导凋亡, 其作用机制可能与过表达 GTPBP2 有关。

**[关键词]** miR-502-3p; GTPBP2 基因; 结直肠癌干细胞; 增殖; 凋亡

**[中图分类号]** R735.3<sup>+</sup>4; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2022)01-0037-06

## miR-502-3p regulates the proliferation and apoptosis of colorectal cancer stem cells by targeting GTPBP2 gene

KE Chao, ZHOU Hongjian, JIANG Bin, XIE Xingwang, ZHANG Chao (Department of Gastrointestinal and Abdominal Wall and Hernia Surgery, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430061, Hubei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the molecular mechanism by which miR-502-3p regulates the proliferation, cell cycle and apoptosis of colorectal cancer stem cells (CCSCs) by targeting GTP binding protein 2 (GTPBP2) gene. **Methods:** The immunomagnetic bead sorting technique was used to sort CCSCs (CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> cells and CD133<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup> cells) from colorectal cancer HCT116 cells, and the expression level of miR-502-3p in the sorted cells was detected by qPCR. CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> cells were divided into different groups according to different transfections using liposome method, namely miR-NC group, miR-502-3p group, si-miR-NC group, si-miR-502-3p group, miR-502-3p+vector group and miR-502-3p+GTPBP2 group. The mRNA expression levels of miR-502-3p and GTPBP2 in cells were detected using qPCR method. The proliferation rate, cell cycle and apoptosis rate were detected by MTT assay and flow cytometry, and the protein expression levels of Ki67, CDK1, Bcl2, BAX and GTPBP2 were detected by WB. Dual-luciferase reporter gene assay adopted to verify the targeting relationship between miR-502-3p and GTPBP2 gene. **Results:** The expression level of miR-502-3p in CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> cells was significantly lower than that in CD133<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup> cells ( $P < 0.01$ ). Compared with the miR-NC group, the cell proliferation rate and the proportion of S phase cells were significantly reduced (all  $P < 0.01$ ), the apoptosis rate and proportion of cells in G0/G1 phase were significantly increased (all  $P < 0.01$ ), the protein expression of Ki67, CDK1 and Bcl2 was significantly down-regulated (all  $P < 0.01$ ), and BAX protein expression was significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ) in the miR-502-3p group. miR-502-3p targetedly regulated the expression of GTPBP2. Overexpression of GTPBP2 could reverse the effects of up-regulation of miR-502-3p on the proliferation, cell cycle and apoptosis of CCSCs. **Conclusion:** Up-regulating the expression of miR-502-3p can inhibits the proliferation, arrests the cell cycle, and induces the apoptosis of CCSCs. The mechanism may be related to the overexpression of GTPBP2 gene.

**[Key words]** miR-502-3p; GTPBP2 gene; colorectal cancer stem cell (CCSC); proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(1): 37-42. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.01.006]

**[基金项目]** 武汉市卫生健康委员会科研项目(No.WX20A07)

**[作者简介]** 柯超(1977—),男,硕士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤的临床治疗研究

**[通信作者]** 柯超, E-mail: kechao@163.com

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一。关于结直肠癌的治疗方法以外科手术、放疗等为主,虽然提高了患者5年生存率,但是其远处转移、复发等仍影响患者的治疗效果<sup>[1-2]</sup>。肿瘤干细胞具有自我更新、多向分化、耐药、高度致瘤等特性,被认为是肿瘤发生、转移和复发的种子细胞<sup>[3]</sup>。目前,众多学者致力于研究肿瘤干细胞和miRNA调控作用,包括如何有效地抑制肿瘤干细胞的发展,以达到治疗肿瘤的目的<sup>[4-5]</sup>。研究结果<sup>[6]</sup>显示,miRNA(如miR-19、miR-501-5p和miR-744)与肿瘤干细胞发展有关。miR-502-3p在胃癌、肺癌等肿瘤中表达失调,与肿瘤细胞增殖、凋亡等有关<sup>[7-8]</sup>,但是对结直肠癌干细胞(colorectal cancer stem cell, CCSC)的研究报道尚不清楚。GTP结合蛋白2(GTP-binding protein 2, GTPBP2)是蛋白质合成GTP酶超家族成员,广泛存在于人体的胰腺、胃、小肠等,且表达水平较高<sup>[9]</sup>,关于GTPBP2对CCSC的作用机制尚不明确。鉴于此,本课题用免疫磁珠实验从结直肠癌HCT116细胞中分选出CCSC,探讨miR-502-3p是否通过调控GTPBP2基因影响CCSC增殖、周期和凋亡的分子机制,旨在为结直肠癌诊断和治疗提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和主要试剂

结直肠癌细胞HCT116购于中科院上海细胞库。胎牛血清、RPMI 1640培养基购于上海联硕生物科技有限公司,表皮生长因子(bFGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购于美国Pepro Tech公司,小鼠抗人CD133和CD44抗体购于德国Miltenyi公司,Lipofectamine 2000试剂盒购于上海研卉生物科技有限公司,miR-NC、miR-502-3p、si-miR-NC、si-miR-502-3p、空载体vector、GTPBP2过表达载体和引物由上海生工公司设计合成,TRIzol试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量PCR(qPCR)试剂盒购于日本TaKaRa公司,MTT试剂盒、BCA试剂盒、电化学发光液购于北京索莱宝公司,细胞凋亡检测试剂盒和细胞周期检测试剂盒购于江苏凯基生物公司,Ki67抗体、CDK1抗体、Bcl2抗体、BAX抗体、GTPBP2抗体、GAPDH抗体购于美国Abcam公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG、荧光素酶报告基因检测试剂盒购于艾美捷科技有限公司。

### 1.2 细胞培养和分选

结直肠癌HCT116细胞在37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。当细胞生长汇合度达85%时,加入胰酶进行消化并制备细胞悬液。将结直肠癌细胞接种于含有2%B27、20 μg/L EGF、20 μg/L bFGF、不含血清的

完全培养基中进行培养,观察细胞成球情况,用第3代细胞与小鼠抗人CD133和CD44抗体包被的磁珠进行培养,采用流式细胞术分选出双阳性细胞(CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>)和双阴性细胞(CD133<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>)。并检测CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞的表达率。

### 1.3 细胞转染及分组

将CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞接种至6孔板中(2×10<sup>5</sup>个/孔),参照Lipofectamine 2000试剂盒说明书的方法将miR-NC、miR-502-3p、si-miR-NC、si-miR-502-3p、miR-502-3p+vector和miR-502-3p+GTPBP2转染至CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞中,分别记为miR-NC组、miR-502-3p组、si-miR-NC组、si-miR-502-3p组、miR-502-3p+vector组和miR-502-3p+GTPBP2组。转染6h后更换细胞培养液,培养48h后进行后续实验。

### 1.4 qPCR法检测CCSC中miR-502-3p和GTPBP2 mRNA的表达

取CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞和CD133<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>细胞,以及转染成功的各组细胞按照TRIzol法提取细胞中总RNA,检测浓度和纯度后,逆转录合成cDNA,将cDNA根据qPCR试剂盒说明书步骤进行PCR扩增反应。引物序列:miR-502-3p上游为5'-ACACTC CAGCTGGGAATGCACCTGGGCAAGG-3',下游为5'-CTCAACTGGTGTCGTGGA-3'; U6上游为5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游为5'-AACGCT TCACGAATTTGCGT-3'; GTPBP2上游为5'-CTG GCTGAGGAGGAAATG-3',下游为5'-CACACG GAGGTCTAGGAAC-3'; GAPDH上游为5'-GAA GGTGAAGGTCGGAGT-3',下游为5'-GAAGAT GGTGATGGGATTTC-3'。PCR反应条件:预变性95℃30s;95℃5s,60℃30s,共循环35次。以U6、GAPDH作为内参基因,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算miR-502-3p和GTPBP2 mRNA的相对表达量。

### 1.5 MTT法检测CCSC的增殖率

将各组CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞接种至96孔板中(5×10<sup>3</sup>个/孔),继续培养48h,每孔加入10 μL MTT试剂,继续培养4h,清除培养液,每孔加入150 μL DMSO试剂。酶标仪检测波长490 nm处每孔光密度(D)值,计算细胞增殖率(实验组D值/对照组D值×100%)。

### 1.6 流式细胞术检测CCSC细胞周期和凋亡水平

细胞周期实验:将miR-NC组、miR-502-3p组、miR-502-3p+vector组、miR-502-3p+GTPBP2组CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞接种至6孔板中(5×10<sup>5</sup>个/孔),PBS清洗后,1200×g离心5 min后收集上清液,加入乙醇溶液,固定过夜。弃去乙醇溶液,加入PI和RNA酶,避光反应15~30 min,上流式细胞仪检测细胞周期变化。

细胞凋亡实验:取各组CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞(同细胞

周期实验),离心后弃去上清液,采用预冷 PBS 进行清洗,加入 PBS 重悬细胞,然后与各 5  $\mu$ L 的 Annexin V-FITC 和 PI 染液混匀,避光反应 15~30 min,置于流式细胞仪检测细胞凋亡水平。

### 1.7 WB 法检测 CCSC 中 Ki67、CDK1、Bcl2、BAX 和 GTPBP2 蛋白的表达

取各组 CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞用蛋白裂解液提取细胞中总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,水浴煮沸反应 5 min,以每孔 35  $\mu$ g 蛋白上样,行 SDS-PAGE,用半干法转移分离的蛋白质至 PVDF 膜上,在含 5% 脱脂奶粉溶液中封闭 2 h,在均以 1:1 000 稀释的 Ki67、CDK1、Bcl2、BAX、GTPBP2 和 GAPDH 一抗中 4  $^{\circ}$ C 过夜。次日在 1:2 500 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗室温下处理 2 h,加入电化学发光液显色,曝光。以 GAPDH 作为内参,应用凝胶成像软件扫描,分析蛋白条带的灰度值。

### 1.8 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-502-3p 与 GTPBP2 的靶向关系

通过 TargetScan 软件预测 miR-502-3p 和 GTPBP2 之间是否存在互补核苷酸序列。将含有 miR-502-3p 结合位点的 GTPBP2 3' UTR 序列克隆至荧光素酶报告基因质粒中,构建 GTPBP2 野生型(GTPBP2 3'UTR WT)和 GTPBP2 突变型(GTPBP2 3' UTR MUT)载体。按照 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书步骤与 miR-NC 或 miR-502-3p 共转染至 CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞中,6 h 后更换细胞培养液,继续培养 48 h,按照荧光素酶试剂盒说明书步骤检测转染细胞的荧光素酶活性。

### 1.9 统计学处理

以上主要实验均重复 3 次。采用 SPSS 22.0 统计

学软件分析实验数据,符合正态分布的计量数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间数据比较采用 *t* 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析,以  $P<0.05$  或  $P<0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

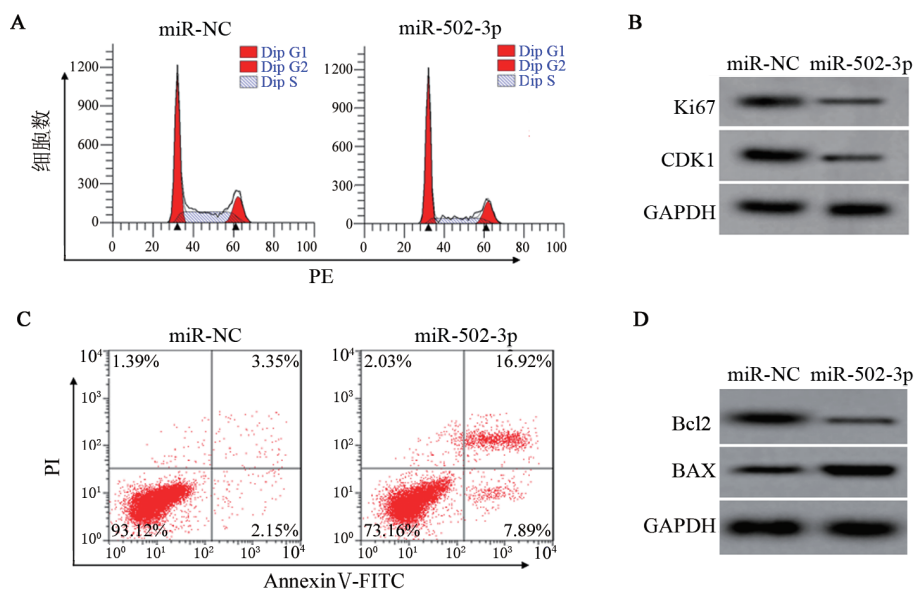
### 2.1 miR-502-3p 在 CCSC 中低表达

利用免疫磁珠分选技术,成功从结直肠癌 HCT116 细胞中获得 CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>和 CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞,CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞阳性率为 94.35%。qPCR 法检测结果显示,CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞中 miR-502-3p 表达水平显著低于 CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞( $0.36\pm 0.05$  vs  $0.99\pm 0.09$ ,  $t=18.357$ ,  $P<0.01$ ),因此,后续实验选择 CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞。

### 2.2 转染 miR-502-3p 对 CCSC 增殖、周期、凋亡及相关蛋白表达的影响

转染 miR-502-3p 后,qPCR 法检测结果显示,miR-502-3p 组 CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞中 miR-502-3p 表达水平显著高于 miR-NC 组细胞( $2.87\pm 0.30$  vs  $1.00\pm 0.07$ ,  $t=18.211$ ,  $P<0.01$ ),表明成功建立 miR-502-3p 过表达细胞,可以进行后续实验。

MTT 法、流式细胞术和 WB 法检测结果(表 1、图 1)显示,与 miR-NC 组比较,miR-502-3p 组细胞增殖率、S 期细胞比例均显著降低(均  $P<0.01$ ),Ki67、CDK1 蛋白表达显著降低(均  $P<0.01$ );细胞凋亡率、G0/G1 期细胞比例均显著升高(均  $P<0.01$ ),Bcl2 蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ),BAX 蛋白表达显著升高( $P<0.01$ )。结果表明,上调 miR-502-3p 可显著抑制 CCSC 增殖、周期进展并诱导细胞凋亡。



A 和 C: 流式细胞术检测细胞周期和凋亡水平;B 和 D: WB 法检测细胞中相关蛋白表达  
图 1 上调 miR-502-3p 对 CCSC 细胞周期及 Ki67、CDK1、Bcl2 和 BAX 蛋白表达的影响



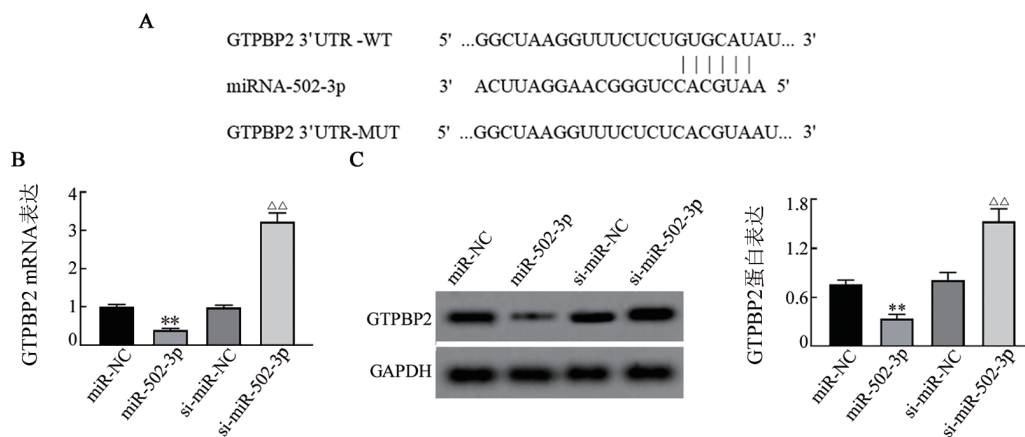
表1 上调miR-502-3p对CCSC增殖、周期和凋亡的影响

组别	细胞增殖率 (%)	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	Ki67	CDK1	细胞凋亡率 (%)	Bcl2	BAX
miR-NC	98.32±7.04	46.16±5.48	39.05±3.05	14.78±0.94	0.80±0.07	0.68±0.04	5.49±0.99	0.66±0.05	0.41±0.07
miR-502-3p	49.15±3.79	59.95±5.87	26.39±4.05	13.65±1.39	0.42±0.04	0.35±0.03	24.81±2.10	0.39±0.03	0.78±0.06
<i>t</i>	18.449	5.152	7.491	2.020	14.140	19.800	24.965	13.891	12.040
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	0.060	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

### 2.3 miR-502-3p靶向负调控GTPBP2表达

TargetScan 软件预测结果显示, miR-502-3p 和 GTPBP2 mRNA 之间存在互补结合位点(图2A)。双荧光素酶实验报告基因实验结果显示, 与 miR-NC 组相比, miR-502-3p 与 GTPBP2 3'UTR WT 载体共转染细胞的荧光素酶活性显著降低(0.41±0.06 vs 0.99±0.07, *t*=18.873, *P*<0.01), 而与 GTPBP2 3'UTR MUT 载体共转染细胞的荧光素酶活性无显著改变(1.01±

0.05 vs 0.98±0.06, *t*=1.152, *P*>0.05)。qPCR 和 WB 实验检测结果(图2B、C)显示, 与 miR-NC 组比较, miR-502-3p 组细胞中 GTPBP2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低(*t*=25.378、17.819, 均 *P*<0.01); 与 si-miR-NC 组比较, si-miR-502-3p 组细胞中 GTPBP2 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高(*t*=29.601、12.348, 均 *P*<0.01)。结果表明, miR-502-3p 靶向负调控 GTPBP2 表达。



与 miR-NC 组比较, \*\**P*<0.01; 与 si-miR-NC 组比较, <sup>△△</sup>*P*<0.01

A: miR-502-3p 与 GTPBP2 的结合位点; B: qPCR 法检测敲低 miR-502-3p 对 GTPBP2 mRNA 表达的影响;

C: WB 实验检测敲低 miR-502-3p 对 GTPBP2 蛋白表达的影响

图2 miR-502-3p 靶向负调控 GTPBP2 的表达

### 2.4 过表达GTPBP2可逆转上调miR-502-3p对CCSC增殖、周期和凋亡的作用

转染 GTPBP2 后, qPCR、MTT、WB 和流式细胞术实验结果(图3、表2)显示, 与 miR-502-3p+vector 组比较, miR-502-3p+GTPBP2 组细胞中 GTPBP2 mRNA 和蛋白的表达水平均显著升高(均 *P*<0.01), 细胞增殖率、S 期细胞比例均显著升高(均 *P*<0.01), 细胞凋亡率、G0/G1 期细胞比例均显著降低(均 *P*<0.01), 细胞中 Ki67、CDK1、Bcl2 蛋白表达均显著升高(均 *P*<0.01)、BAX 蛋白表达显著降低(*P*<0.01)。实验结果表明, 过表达 GTPBP2 可逆转上调 miR-502-3p 对 CCSC 增殖、细胞周期和凋亡的作用。

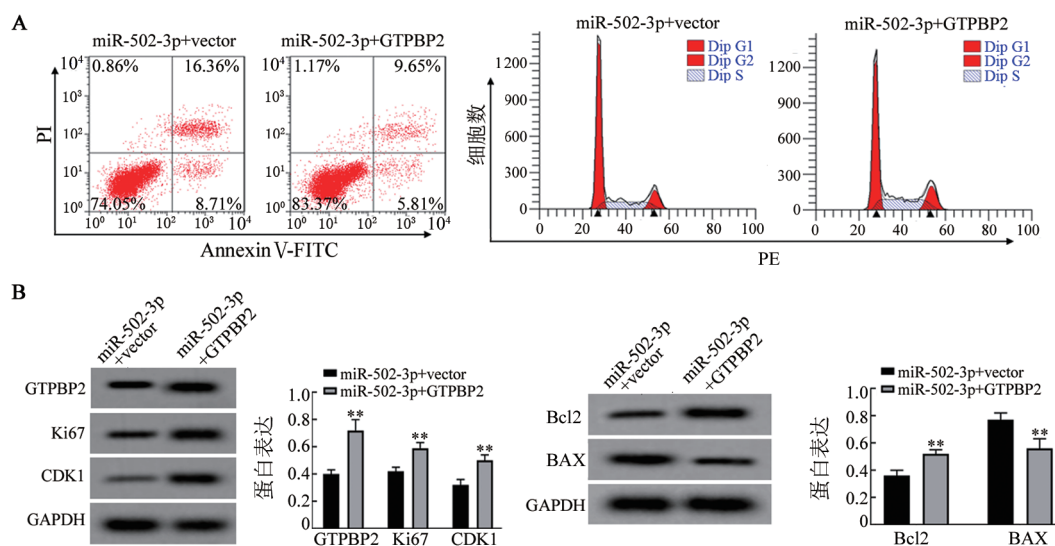
## 3 讨论

肿瘤干细胞是一群独特的细胞亚群, 因其具有

高度致瘤性而参与肿瘤的发展, 对肿瘤细胞分化、增殖、转移等有重要的作用<sup>[10-12]</sup>。有研究结果<sup>[13]</sup>显示, miRNA 与 CCSC 发展有关, 如 miR-451a 在结直肠癌细胞中表达水平较低, 过表达 miR-451a 降低了 CCSC 中 Ki-67、cyclin D1 的表达, 抑制 CCSC 增殖。VILLANOVA 等<sup>[14]</sup>通过对 CCSC 的功能研究发现, miR-1285 通过靶向调控细胞凋亡相关蛋白酶 2 表达抑制细胞增殖和阻滞周期, 诱导细胞凋亡。阎立昆等<sup>[15]</sup>研究发现, miR-1231 在 CCSC 中表达水平降低, 过表达 miR-1231 抑制结直肠癌细胞增殖、迁移, 并促进细胞凋亡。关于 miR-502-3p 的研究主要集中在胃癌, 如 miR-502-3p 在胃癌细胞中低表达, 过表达 miR-502-3p 能抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭并诱导细胞凋亡<sup>[16]</sup>, 但是对 CCSC 的作用尚不清楚。本研究利用免疫磁珠分选技术, 从结直肠癌 HCT116 细胞

中分选出双阴性细胞(CD133<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>)和双阳性细胞(CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>), qPCR法检测结果发现, miR-502-3p在CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细胞中表达水平显著低于CD133<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>细胞, 说明miR-502-3p与CCSC发展有关。将miR-502-3p过表达质粒转染CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>细

胞后, 结果发现细胞增殖率、S期细胞比例显著降低, 细胞凋亡率、G0/G1期细胞比例显著升高, 细胞中Ki67、CDK1、Bcl2蛋白表达下调、BAX蛋白表达上调, 说明上调miR-502-3p抑制CCSC增殖、阻滞细胞周期并诱导细胞凋亡, 这与上述研究结果相似。



与miR-502-3p+vector组相比, \*\* $P < 0.01$

A: 流式细胞术检测细胞周期和凋亡水平; B: WB法检测相关蛋白的表达

图3 过表达GTPBP2可逆转上调miR-502-3p对CCSC的作用

表2 过表达GTPBP2可逆转上调miR-502-3p对CCSC增殖、周期和凋亡的影响

组别	GTPBP2 mRNA	GTPBP2 蛋白	细胞增殖率(%)	G0/G1(%)	S(%)	G2/M(%)	细胞凋亡率(%)
miR-502-3p+vector	1.00±0.07	0.40±0.03	48.03±3.91	62.48±5.52	23.35±3.11	14.16±2.20	25.09±2.52
miR-502-3p+GTPBP2	2.38±0.16	0.72±0.08	64.02±4.12	52.88±3.99	31.06±4.48	16.06±1.79	15.46±1.16
<i>t</i>	23.706	11.236	8.445	4.228	2.241	2.010	10.414
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.062	<0.001

GTPBP2是GTPase家族四个家族成员之一, 其存在于所有真核细胞中, 位于人类染色体6p21-12区域, 与蛋白合成、细胞信号转导、骨架调节等密切相关, 在人体卵巢、脑、胰腺、骨骼肌等组织中均有表达<sup>[10,17-18]</sup>。关于GTPBP2与肿瘤的研究相对较少, 主要在人类遗传学中研究较多<sup>[19]</sup>。最近的研究结果<sup>[20]</sup>显示, GTPBP2在非小细胞肺癌组织和细胞中表达上调, 其高表达与患者TNM分期和淋巴结转移相关; 敲低GTPBP2抑制非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。但是GTPBP2在结直肠癌中的作用尚不清楚。本研究通过在线数据库预测发现, GTPBP2是miR-502-3p靶基因, 通过双荧光素报告基因实验和qPCR实验验证二者的关系, 结果发现miR-502-3p调控GTPBP2的表达。上调miR-502-3p降低CCSC中GTPBP2 mRNA和蛋白表达水平, 下调miR-502-3p则上调GTPBP2 mRNA和蛋白表达水平, 结果表明

miR-502-3p靶向负调控GTPBP2的表达。进一步实验的结果显示, 过表达GTPBP2可以部分逆转上调miR-502-3p对CCSC增殖、细胞周期和凋亡的作用。

综上所述, miR-502-3p在CCSC中表达下调, miR-502-3p靶向负调控GTPBP2的表达, 从而抑制CCSC的增殖和阻滞细胞周期并促进细胞凋亡。关于GTPBP2对CCSC作用的具体机制有待深入研究。

#### [参考文献]

- [1] JOHDI N A, SUKOR N F. Colorectal cancer immunotherapy: options and strategies[J/OL]. Front Immunol, 2020, 11: 1624[2021-07-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7530194/>. DOI:10.3389/fimmu.2020.01624.
- [2] MAURI G, PIZZUTILO E G, AMATU A, et al. Retreatment with anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer: Systematic review of different strategies[J]. Cancer Treat Rev, 2019, 73: 41-53. DOI:10.1016/j.ctrv.2018.12.006.

- [3] TOH T B, LIM J J, CHOW E K. Epigenetics in cancer stem cells [J/OL]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 29[2021-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28148257/>. DOI:10.1186/s12943-017-0596-9.
- [4] ZHANG S, ZHANG X. Shrimp miRNA suppresses the stemness of human cancer stem cells via the PIN1 pathway[J]. *FASEB J*, 2019, 33(10): 10767-10779. DOI:10.1096/fj.201900395rr.
- [5] MENS M M J, GHANBARI M. Cell cycle regulation of stem cells by microRNAs[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2018, 14(3): 309-322. DOI: 10.1007/s12015-018-9808-y.
- [6] KHAN A Q, AHMED E I, ELAREER N R, *et al.* Role of miRNA-regulated cancer stem cells in the pathogenesis of human malignancies[J/OL]. *Cells*, 2019, 8(8): E840[2021-07-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6721829/>. DOI: 10.3390/cells8080840.
- [7] ZHANG J, HOU L D, LIANG R, *et al.* CircDLST promotes the tumorigenesis and metastasis of gastric cancer by sponging miR-502-5p and activating the NRAS/MEK1/ERK1/2 signaling[J/OL]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 80[2021-07-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6449953/>. DOI: 10.1186/s12943-019-1015-1.
- [8] OU Y J, DENG Y, WANG H, *et al.* Targeting antisense lncRNA PRKAG2-AS1, as a therapeutic target, suppresses malignant behaviors of hepatocellular carcinoma cells[J/OL]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 649279[2021-07-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8076551/>. DOI:10.3389/fmed.2021.649279.
- [9] KUDO H, SENJU S, MITSUYA H, *et al.* Mouse and human GTPBP2, newly identified members of the GP-1 family of GTPase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 272(2): 456-465. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2763.
- [10] BATLLE E, CLEVERS H. Cancer stem cells revisited[J]. *Nat Med*, 2017, 23(10): 1124-1134. DOI:10.1038/nm.4409.
- [11] GUPTA R, BHATT L K, JOHNSTON T P, *et al.* Colon cancer stem cells: Potential target for the treatment of colorectal cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(8): 1068-1082. DOI:10.1080/15384047.2019.1599660.
- [12] 杨婷, 冉宇靓. 靶向肿瘤干细胞治疗肿瘤[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(7): 651-658. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-2346.2011.02.001.
- [13] 严秀蕊, 马海滨, 贾元元, 等. microRNA-451a 在人结肠癌中的表达及其对结肠癌细胞增殖的影响[J]. *宁夏医科大学学报*, 2018, 40(12): 1398-1403. DOI:10.16050/j.cnki.issn1674-6309.2018.12.008.
- [14] VILLANOVA L, BARBINI C, PICCOLO C, *et al.* miR-1285-3p controls colorectal cancer proliferation and escape from apoptosis through DAPK2[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): E2423[2021-07-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7177834/>. DOI:10.3390/ijms21072423.
- [15] 阎立昆, 李伟, 姚建锋, 等. miR-1231 对结肠癌干细胞增殖、凋亡和侵袭的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(45): 6746-6752. DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2016.45.009.
- [16] LI Y, GONG Y, MA J, *et al.* Overexpressed circ-RPL15 predicts poor survival and promotes the progression of gastric cancer via regulating miR-502-3p/OLFM4/STAT3 pathway[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110219[2021-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32559850/>. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110219.
- [17] GILLIS W Q, KIRMIZITAS A, IWASAKI Y, *et al.* GTPBP2 is a positive regulator of Wnt signaling and maintains low levels of the Wnt negative regulator Axin[J/OL]. *Cell Commun Signal*, 2016, 14(1): 15[2021-07-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4969687/>. DOI:10.1186/s12964-016-0138-x.
- [18] ZINOVIEV A, GOYAL A, JINDAL S, *et al.* Functions of unconventional mammalian translational GTPases GTPBP1 and GTPBP2[J/OL]. *Genes Dev*, 2018, 32(17/18): 1226-1241[2021-07-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6120710/>. DOI: 10.1101/gad.314724.118.
- [19] BERTOLI-AVELLA A M, GARCIA-AZNAR J M, BRANDAU O, *et al.* Biallelic inactivating variants in the GTPBP2 gene cause a neurodevelopmental disorder with severe intellectual disability[J/OL]. *Eur J Hum Genet*, 2018, 26(4): 592-598[2021-07-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5891495/>. DOI: 10.1038/s41431-018-0097-3.
- [20] LIU J, LI C, WEI C H, *et al.* GTPBP2 positively regulates the invasion, migration and proliferation of non-small cell lung cancer [J]. *J Cancer*, 2021, 12(13): 3819-3826. DOI:10.7150/jca.48340.

[收稿日期] 2021-08-21

[修回日期] 2021-12-16

[本文编辑] 党瑞山