

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.005

· 基础研究 ·

miR-145-5p 通过靶向 RAD18 调控结直肠癌细胞的增殖与 NK 细胞的细胞毒作用

李丽, 姚红亮(衡水市人民医院 外科, 河北 衡水 053000)

[摘要] **目的:** 探索 RAD18 影响结直肠癌细胞增殖及调节 NK 细胞对结直肠细胞的杀伤作用及其可能的机制。**方法:** 采用生物信息学技术分析结直肠癌组织中 RAD18 和 miR-145-5p 的表达及两者之间的调控关系、分析 RAD18 富集通路。采用 qPCR 法验证 RAD18 和 miR-145-5p 在结直肠癌细胞中的表达, 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-145-5p 与 RAD18 的调控关系。按转染物的不同将 SW480、HCT-15 细胞分为将 si-RAD18 组、si-NC 组, 另向 SW480 细胞分别转染 inhibitor-NC+si-NC、miR-145-5p inhibitor+si-NC 或 miR-145-5p inhibitor+si-RAD18, 采用 CCK-8 法、克隆形成实验分别检测敲降 miR-145-5p 和/或 RAD18 对细胞增殖、克隆形成的影响; 将各组细胞分别与经 IL-2 激活的 NK92 细胞共培养, 采用乳酸脱氢酶释放法、ELISA 和免疫荧光染色法分别检测 NK 细胞的细胞毒性、细胞因子分泌及细胞表面穿孔素和颗粒酶 B 表达的影响。**结果:** RAD18 在结直肠癌组织和细胞中呈高表达(均 $P < 0.01$)。敲降 RAD18 可以抑制结直肠癌细胞增殖能力($P < 0.05$)和促进 NK 细胞活力、细胞毒性、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF 分泌及穿孔素和颗粒酶 B 的表达(均 $P < 0.05$)。双荧光素酶报告实验验证了 RAD18-3' UTR 与 miR-145-5p 的结合关系, miR-145-5p 在结直肠癌组织和细胞中低表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。miR-145-5p 可以靶向下调 RAD18 的表达($P < 0.05$), 过表达 RAD18 可以逆转 miR-145-5p 过表达对 NK 细胞杀伤效应的促进作用(均 $P < 0.05$)。**结论:** miR-145-5p 可靶向下调 RAD18 的表达, miR-145-5p/RAD18 轴能够影响结直肠癌细胞的增殖和 NK 细胞对其的细胞毒作用。

[关键词] 结直肠癌; miR-145-5p; RAD18; NK 细胞; SW480 细胞; HCT-15 细胞

[中图分类号] R735.3; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)08-0681-08

miR-145-5p affects the proliferation of colorectal cancer cells and cytotoxicity of NK cells by targeting regulation of RAD18 expression

LI Li, YAO Hongliang (Department of Surgery, Hengshui People's Hospital, Hengshui 053000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the possible mechanism of RAD18 affecting the proliferation of colorectal cancer cells and regulating the killing effect of NK cells on colorectal cells. **Methods:** Bioinformatics was used to analyze the expression of RAD18 and miR-145-5p in colorectal cancer tissues and the regulatory relationship between them, and to analyze the RAD18 enrichment pathway. The expression of RAD18 and miR-145-5p in colorectal cancer cells was verified by qPCR. Dual-luciferase reporter gene assay verified the regulatory relationship between miR-145-5p and RAD18. SW480 and HCT-15 cells were divided into si-RAD18 group and si-NC group according to the transfection; and SW480 cells were transfected inhibitor-NC+si-NC, miR-145-5p inhibitor+si-NC or miR-145-5p inhibitor+si-RAD18, respectively. The effects of knocking down miR-145-5p and/or RAD18 on cell proliferation and clonalization were detected by CCK-8 method and cloning formation experiments, respectively. The cells of each group were co-cultured with IL-2-activated NK92 cells, and the cytotoxicity, cytokine secretion, cell surface perforin and granzyme B expression of NK cells were detected by lactate dehydrogenase release assay, ELISA and immunofluorescence staining, respectively. **Results:** RAD18 was significantly over-expressed in colorectal cancer tissues and cells (all $P < 0.01$). Silencing RAD18 can inhibit proliferation of colorectal cancer cells ($P < 0.05$), promote NK cell viability, cytotoxicity, secretion of IFN- γ , TNF- α , GM-CSF and expression of perforin and granulocyte B (all $P < 0.05$). In addition, dual-luciferase reporter assay verified the binding relationship between RAD18-3' UTR and miR-145-5p, which is underexpressed in colorectal cancer tissues and cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). miR-145-5p can down-regulate the expression of RAD18 by targeting ($P < 0.05$), and over-expression of RAD18 can reverse the promotion effect of miR-145-5p over-expression on NK cell killing (all $P < 0.05$). **Conclusion:** miR-145-5p can target down-regulation of RAD18 expression, and the miR-145-5p/RAD18 axis can affect the proliferation of colorectal cancer cells and the cytotoxic effect of NK cells.

[Key words] colorectal cancer; miR-145-5p; RAD18; NK cell; SW480 cell; HCT-15 cell

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(8): 681-688. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.08.005]

[基金项目] 河北省医学科学研究课题计划(No. 20211322)

[作者简介] 李丽(1985—), 女, 本科, 主治医师, 主要从事结直肠癌的临床诊治工作, E-mail: yllto1yk@163.com

[通信作者] 姚红亮, E-mail: yhl198615@outlook.com

结直肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一^[1-2]。手术、化疗和放疗及联合治疗是结直肠癌的标准治疗手段^[3]。尽管近年来结直肠癌患者的治疗取得了较大的进展,但转移性结直肠癌患者的5年生存率仅为20%^[4]。因此,迫切需要开发新的治疗策略以改善患者生存情况。肿瘤免疫疗法是一种新型的疗法,该疗法是利用患者自身的免疫系统来对抗癌细胞,以其特异性和低毒性为肿瘤患者的治疗带来了希望^[5]。NK细胞是机体自然免疫系统的重要组成部分,它可通过接触依赖性细胞毒性和产生细胞因子来消除肿瘤细胞,以进行免疫调节^[6]。如TANG等^[6]发现,miR-20a通过抑制结直肠癌细胞上的MICA表达显著降低了NK细胞对结直肠癌细胞的杀伤作用。因此,揭示NK细胞在结直肠癌中的作用机制可能是结直肠癌治疗的新方向,对靶向免疫微环境的结直肠癌免疫治疗至关重要。RAD18是一种DNA损伤激活的E3泛素连接酶,可作为关键调节因子,通过监测DNA损伤信号来协调同源重组修复^[7]。RAD18已被证实为多种恶性肿瘤中的促癌基因,与癌症的转移相关^[8]。如在人食管鳞状细胞癌中,RAD18上调表达,并通过JNK-MMP途径促进肿瘤细胞的迁移和侵袭^[9]。卵巢癌中,LINC00858结合miR-134-5p促进RAD18的表达,进而促进肿瘤细胞增殖、迁移、EMT并抑制细胞凋亡^[10]。目前,尚少见关于RAD18对NK细胞杀伤作用影响的研究报道,RAD18在结直肠癌中的关于NK细胞杀伤机制尚不清晰。因此,本研究探究RAD18在结直肠癌中对NK细胞功能的调节作用。

1 材料与方法

1.1 TCGA数据分析差异表达基因

从TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载结直肠癌的mRNA表达量数据(normal: 51, tumor: 647),通过EdgeR差异分析($|\log_{2}FC| > 1$, $padj < 0.05$),得到差异表达mRNA,通过文献引证确定目标mRNA,通过Starbase预测RAD18上游调控miRNA,并预测结合位点。对靶基因作基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)分析,深入分析其影响结直肠癌的途径。

1.2 细胞及主要试剂

人NK细胞系NK92、人正常结肠黏膜上皮细胞系CCD-18Co、人结直肠癌细胞系(LS174T、HCT116、HCT-15、SW480、LOVO)和人肾上皮细胞293T均购自ATCC。免疫荧光抗体anti-perforin、anti-granzyme B及人IFN- γ 、人TNF- α 、人GM-CSF ELISA试剂盒均购自英国Abcam公司。IL-2购自美国BD

Biosciences公司, si-RAD18、miR-145-5p mimic(miR-mimic)、miR-145-5p inhibitor(miR-inhibitor)以及对应的阴性对照均购自锐博生物公司, Lipofectamine 2000试剂盒、全波长扫描式多功能读数仪Varioskan Flash System均购自美国Thermo Fisher公司, CCK-8检测试剂盒购自日本Dojindo公司,用于RT-PCR和qPCR实验的PrimeScript RT Reagent Kit及TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)均购自日本TaKaRa公司,用于乳酸脱氢酶(LDH)释放实验中检测LDH释放量的CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测试剂盒和双荧光素酶报告基因系统均购自美国Promega公司。

1.3 细胞培养及转染

CCD-18Co、LS174T、HCT116、HCT-15、SW480、LOVO和293T细胞均采用含有10% FBS的DMEM/F12培养液,于37℃、含5% CO₂的培养箱中培养。

NK92细胞用含有10%马血清、10%胎牛血清、0.1 mmol/L β -巯基乙醇和1%双抗的MEM α 培养基于37℃、含5% CO₂的培养箱中培养。为了激活NK92细胞, NK92细胞用100 U/ml的IL-2(BD Biosciences, USA)刺激24 h促进甘油三酯的积累,降低甘油的水平。

将si-RAD18、miR-145-5p mimic、miR-145-5p inhibitor以及对应的阴性对照使用Lipofectamine 2000试剂盒将上述质粒转染到对应的结直肠癌细胞中。

将人结直肠癌细胞用含10% FBS的DMEM/F12培养基稀释为 1.5×10^5 个/mL的细胞悬液。取经IL-2激活的NK92细胞与经不同转染处理后的结直肠癌细胞在37℃下以10:1的效应细胞/靶细胞(E:T)比共培养4 h,收集培养上清液,进行后续实验^[11]。

1.4 CCK-8法检测结直肠癌细胞的增殖活力

使用CCK-8法检测细胞存活率。将各组结直肠癌细胞(1×10^4 /孔)接种于96孔板中。将10 μ L CCK-8溶液分别于0、24、48、72 h后添加到每个孔中,再继续培养2 h,使用Varioskan Flash System检测450 nm波长处各孔的光密度(D)值,用D值代表细胞活力。

1.5 克隆形成实验检测结直肠癌细胞克隆形成能力

将结直肠癌细胞(400个)接种至12孔板中,于细胞培养箱中培养10 d。用4%多聚甲醛固定15 min,移除多聚甲醛,用0.2%结晶紫染色5 min,用自来水洗涤细胞、晾干、拍照并计数细胞克隆,计算克隆形成率。克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 LDH释放法测定NK细胞对结直肠癌细胞的细胞毒性

IL-2激活的NK92细胞与经不同转染的结直肠癌细胞在37℃下以10:1的效应细胞:靶细胞(E:T)

比混合,按试剂盒说明进行检测,同时设置效应细胞自发LDH释放对照孔、靶细胞自发LDH释放对照孔、靶细胞最大LDH释放对照孔、体积校正对照孔和培养基背景对照孔,在96孔板中共培养4h,向各孔中加入10 μ L 10 \times 裂解液(培养体系为100 μ L),反应45 min后,向每个孔中添加50 μ L CytoTox 96试剂。室温黑暗条件下静置30 min,加入50 μ L终止液,测定各孔在490 nm处的D值^[12]。用D值代表LDH释放水平,计算NK细胞杀伤结直肠癌细胞的杀伤率,细胞杀伤率=(实验组D值-效应细胞自发实验组D值)/(靶细胞最大组D值-靶细胞自发组D值) \times 100%。

1.7 ELISA法检测NK细胞的细胞因子分泌水平

收集IL-2激活的NK92细胞与不同转染处理的结直肠癌细胞,以E:T=10:1混合后共培养4h,收集上清液,分别使用人IFN- γ 、人TNF- α 、人GM-CSF ELISA试剂盒测定IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF的水平。使用Varioskan Flash System测定在450 nm处的D值。

1.8 免疫荧光染色法检测NK细胞表面穿孔素和颗粒酶B的表达

参照HUANG等^[12]描述的方法进行免疫荧光染色实验。

1.9 qPCR法检测结直肠癌细胞中miR-145-5P和RAD18的mRNA的表达

TRIzol法分别提取各组细胞的总RNA,采用PrimeScript RT Reagent Kit合成cDNA,随后,使用TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II试剂盒按照说明书进行qPCR。使用以下条件进行PCR循环:95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s和60 $^{\circ}$ C 60 s,共45个循环;95 $^{\circ}$ C解离10 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。GAPDH作为mRNA的内参基因,U6作为miR-145-5p的内参基因。引物序列见表1。

表1 qPCR引物序列

| 目的基因 | 引物序列(5'→3') |
|------------|--|
| miR-145-5p | F:TGTCCAGTTTTCCAGGAATC R:CTCAACTGGTGTCGTGGAGTC |
| U6 | F:CCTGCTTCGGCAGCACAT R:AACGCTTCACGAATTTGCGT |
| RAD18 | F:TGTGATTAACCTAGTGTTATTTTCTT R:GCATCCTAGTCTTCTCTATATTTTCG |
| GAPDH | F:CCCCGGTTTCTATAAATTGAGC R:CACCTTCCCCATGGTGTCT |

1.10 双荧光素酶报告实验验证miR-145-5p与RAD18的靶向关系

首先构建pmirGLO-RAD18-3'-UTR-WT和pmirGLO-RAD18-3'-UTR-MUT荧光素酶报告基因载体,然后将293T接种在96孔板中(2×10^5 个/孔)并

将3 μ g miR-mimic/miR NC和RAD18-WT/RAD18-MUT质粒共转染到细胞中。培养48 h后根据制造商的说明使用双荧光素酶报告基因系统测定荧光素酶活性。

1.11 统计学处理

所有定量实验独立重复3次,采用GraphPad Prism 6软件进行统计分析。符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并通过t检验或单因素方差分析进行组间差异比较,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

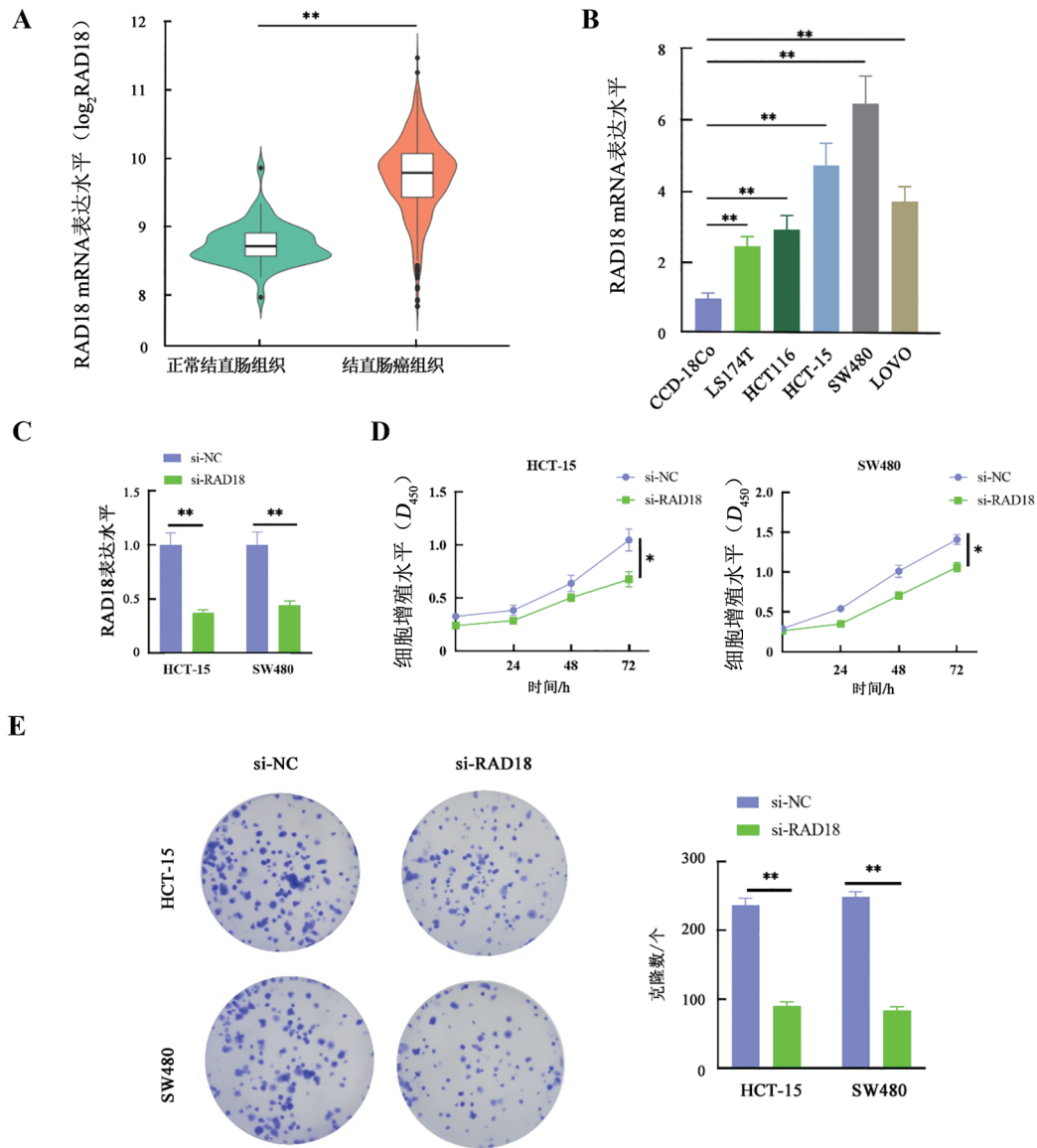
2 结果

2.1 RAD18促进结直肠癌细胞的增殖

分析TCGA-结直肠癌数据,结果显示,RAD18在结直肠癌组织中表达上调($P < 0.01$,图1A);与人正常结肠黏膜上皮细胞相比,RAD18在结直肠癌细胞系中显著上调(均 $P < 0.01$,图1B)。根据RAD18在结直肠癌细胞中的表达情况,后续选择HCT-15、SW480细胞构建RAD18敲低表达细胞模型。qPCR检测结果(图1C)显示,转染si-RAD18显著降低了HCT-15和SW480细胞中RAD18的表达水平(均 $P < 0.01$)。CCK-8法检测细胞活力结果(图1D)发现,转染si-RAD18显著降低了HCT-15和SW480细胞活力(均 $P < 0.05$)。克隆形成实验检测细胞增殖结果(图1E)发现,si-RAD18显著降低了HCT-15和SW480细胞的增殖能力(均 $P < 0.01$)。上述结果表明RAD18在结直肠癌组织和细胞中显著高表达,并能够促进结直肠癌细胞的增殖。

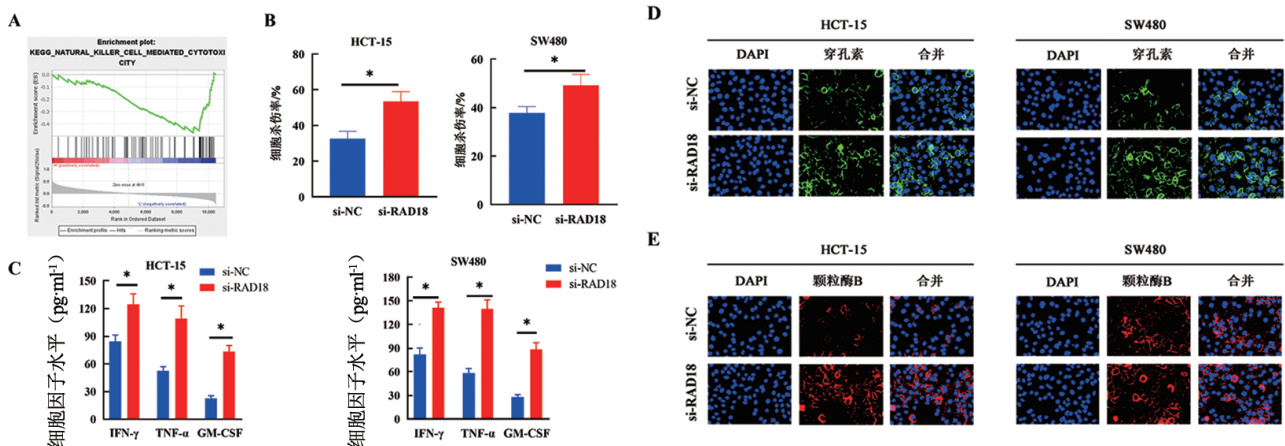
2.2 RAD18抑制NK细胞对结直肠癌细胞的杀伤作用

GSEA通路富集分析发现,RAD18富集在NK细胞介导的细胞毒性通路上(图2A)。据此,本课题组认为RAD18可能通过NK细胞的杀伤作用影响结直肠癌细胞的恶性进展。用IL-2(100 U/mL)刺激并激活NK92细胞,同时构建了RAD18敲低表达的HCT-15和SW480细胞,与IL-2激活的NK92细胞共培养来探究RAD18对活化的NK细胞的影响,LDH法检测NK细胞的细胞毒性。实验结果显示,与对照组相比,si-RAD18组NK细胞的细胞杀伤率显著提高($P < 0.05$,图2B)。ELISA检测IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF的分泌水平结果显示,转染si-RAD18显著增加了NK细胞的IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF的分泌水平($P < 0.05$,图2C)。此外,免疫荧光染色法检测毒性分子穿孔素和颗粒酶B的表达水平,结果显示,与对照组相比,si-RAD18组细胞中穿孔素和颗粒酶B的表达显著增加(均 $P < 0.05$,图2D、E)。以上结果表明,RAD18抑制NK细胞对结直肠癌细胞的杀伤作用。



A: 基于TCGA-结直肠癌数据分析的RAD18在结直肠癌组织中的表达; B: qPCR检测RAD18 mRNA在结直肠癌细胞中的表达; C: qPCR检测转染siRNA后结直肠癌细胞RAD18 mRNA的表达; D: CCK-8法检测证实si-RAD18能降低HCT-15和SW480细胞的增殖活力; E: 克隆形成实验证实si-RAD18能降低HCT-15和SW480细胞的克隆形成能力。^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01。

图1 RAD18对结直肠癌细胞增殖的影响



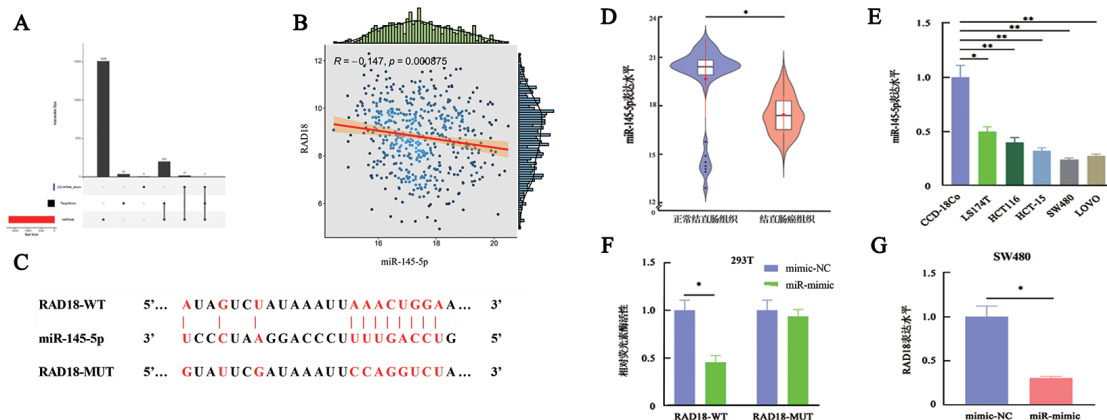
A: 分析富集RAD18s相关通路; B: LDH释放法检测NK细胞对结直肠癌细胞的细胞毒性; C: ELISA检测NK细胞IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF的分泌水平; D: 免疫荧光法检测穿孔素的表达($\times 200$); E: 免疫荧光法检测颗粒酶B的表达($\times 200$)。 ^{*}*P*<0.05。

图2 RAD18抑制NK细胞对结直肠癌细胞的杀伤作用

2.3 RAD18存在上游调控分子miR-145-5p

为了进一步挖掘RAD18调节NK细胞杀伤作用的分子机制,本课题通过生物信息数据预测RAD18上游调控分子,并通过相关性分析发现RAD18与miR-145-5p的表达呈负相关($r=-0.147, P<0.01$,图3A、B)。Starbase数据库预测结果显示其miR-145-5p与RAD18-3'UTR存在潜在结合位点(图3C)。通过生物信息数据分析和qPCR检测发现,E2F2在结直肠癌

组织和细胞中的表达显著下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图3D、E)。随后,双荧光素酶报告基因实验结果发现,过表达miR-145-5p能够显著降低RAD18-WT的荧光酶活性($P<0.05$),对RAD18-MUT没有影响(图3F)。此外,过表达miR-145-5p显著降低了SW480细胞中RAD18的表达($P<0.05$,图3G)。以上实验结果表明miR-145-5p靶向抑制RAD18的表达。



A:基于生物信息数据库分析与RAD18相关上调的miRNA的Upsetplot图;B:Pearson相关性分析miR-145-5p与RAD18表达相关性;C:Starbase数据库分析miR-145-5p与RAD18的结合位点;D:TCGA-结直肠癌数据库分析miR-145-5p的表达;E:qPCR检测结直肠癌细胞中miR-145-5p的表达;F:双荧光素酶报告基因实验验证miR-145-5p与RAD18的结合关系;G:qPCR检测过表达miR-145-5p对SW480细胞中RAD18表达的影响。 $*P<0.05, **P<0.01$ 。

图3 miR-145-5p靶向抑制RAD18的表达

2.4 miR-145-5p通过靶向RAD18促进NK细胞对结直肠癌细胞的杀伤作用

为了证明结直肠癌中miR-145-5p/RAD18轴在NK细胞的杀伤作用中功能,设置了3个不同处理组(inhibitor-NC+si-NC组、miR-inhibitor+si-NC组、miR-inhibitor+si-RAD18组)处理结直肠癌细胞并进行后续实验。qPCR检测结果显示,与对照组相比,miR-inhibitor+si-NC组细胞中RAD18显著上调(3.43 ± 0.26 vs $1.0 \pm 0.14, P<0.05$),miR-inhibitor+si-RAD18组细胞RAD18表达恢复至对照组水平。细胞克隆形成实验(图4A)和CCK-8法(图4B)检测,结果显示,与对照组相比miR-inhibitor+si-NC组细胞活力和细胞克隆数[(436 ± 39.85) vs (196 ± 14.51)个]显著提高均 $P<0.05$,而miR-inhibitor+si-RAD18组细胞活力和细胞克隆数[(215 ± 20.04)个]恢复至对照组水平。随后将不同转染处理后的细胞与IL-2激活的NK92细胞共培养,LDH法检测NK细胞毒性,结果显示,与对照组相比,miR-inhibitor+si-NC组的NK细胞毒性显著下降(26.9 ± 2.64 vs $41.58 \pm 4.03, P<0.05$),进一步敲低表达RAD18(44.37 ± 3.85)可以逆转沉默miR-145-5p对NK细胞毒性的抑制作用。此外,miR-mimic+si-NC

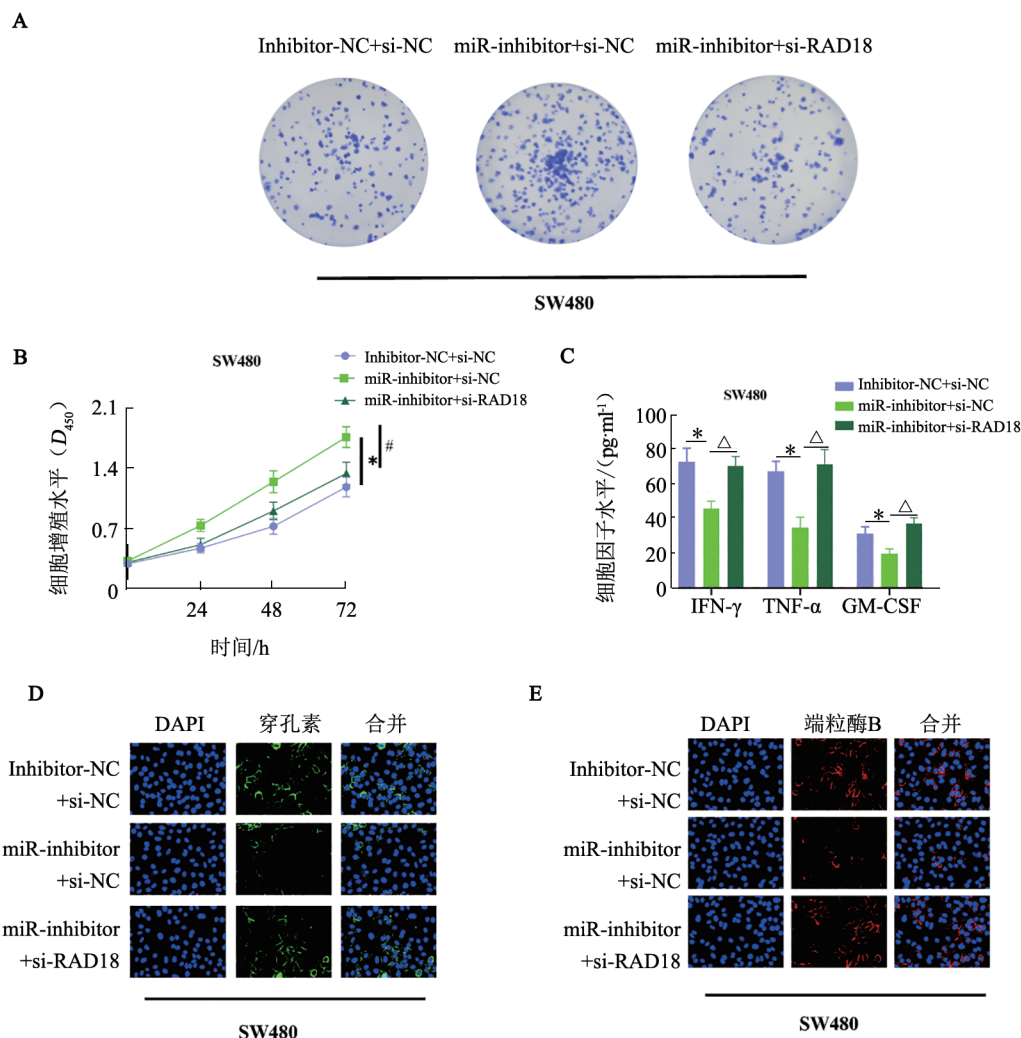
组的NK细胞IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF的分泌显著提高,进一步敲低表达RAD18可以逆转沉默miR-145-5p对NK细胞分泌IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF的抑制作用($P<0.05$,图4C)。沉默miR-145-5p可以抑制穿孔素和颗粒酶B的表达,沉默miR-145-5p的同时敲低RAD18使穿孔素和颗粒酶B的表达恢复至对照组水平($P<0.05$,图4D、E)。综上,以上结果表明miR-145-5p通过靶向RAD18促进NK细胞对结直肠癌细胞的杀伤作用。

3 讨论

结直肠癌约占全球所有新发癌症病例的10%,是癌症相关死亡的第二常见原因^[13-14]。近年来,RAD18已被确定参与调节多种癌症的增殖、迁移和化疗敏感性^[15]。最近,RAD18在结直肠癌中的作用有诸多报道,LIU等^[16]发现,过表达RAD18可诱导DNA损伤修复,促进结直肠癌细胞5-FU耐药性。LI等^[17]发现,RAD18在结直肠癌组织中上调表达并促进细胞侵袭与迁移能力。在本研究中,目前的结果表明RAD18在结直肠癌中高表达,并促进结直肠癌细胞活力和增殖能力,与前人研究一致。

此外,本研究通过生物信息数据分析发现RAD18富集在NK细胞介导的细胞毒作用信号通路。NK细胞因其自主杀伤靶细胞的能力而得名,在固有免疫中,NK细胞是癌症的主要效应细胞,在微环境中具有高度异质性。近年来,大量的研究表明NK细胞的杀伤作用对于清除肿瘤细胞非常重要。如IL-2激活的NK细胞可以有效杀伤结肠癌细胞^[18]。LONG等^[19]发现,Reovirus通过TLR3途径增强NK细胞对结

直肠癌的细胞毒性。在本研究中,发现沉默RAD18可以增强结直肠癌中NK细胞毒性。目前,越来越多的研究集中于基于NK细胞的癌症免疫治疗。NK细胞毒性降低和转移发生率之间的相关性已在头颈部鳞状细胞癌和鼻咽癌中得到证实^[20]。这些研究表明,NK细胞在抗肿瘤免疫治疗中发挥重要作用。综上,提示基于NK细胞的抗肿瘤免疫疗法有望在未来的临床治疗中取得突破。



A: 克隆形成实验检测细胞克隆数;B:CCK-8 检测细胞增殖活力;C:ELISA 检测NK细胞IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF的分泌水平;D:免疫荧光法检测穿孔素的表达($\times 200$);E:免疫荧光法检测颗粒酶B的表达($\times 200$)。*vs inhibitor-NC+oe-NC,[^]vs miR-inhibitor+si-NC,* $P < 0.05$ 。

图4 miR-145-5p通过靶向RAD18促进NK细胞对结直肠癌细胞的杀伤作用

值得关注的是,还发现RAD18存在上游调控分子miR-145-5p。先前研究报道了miR-145-5p对胃癌^[21]、食管癌^[22-23]、肺癌^[24]和乳腺癌^[25]等肿瘤的抗癌作用。如CHEN等^[26]报道miR-145-5p通过靶向CDCA3抑制结直肠癌细胞的增殖、转移和EMT。ZHUANG等^[27]报道miR-145-5p通过ANGPT2/NOD_LIKE_RECEPTOR轴抑制胃癌上皮细胞的增殖、迁移和侵袭。在本研究中,同样也证实miR-145-5p在结直肠

癌细胞中显著下调表达,沉默miR-145-5p促进结直肠癌细胞的增殖。此外,沉默miR-145-5p抑制NK细胞对结直肠癌细胞的杀伤作用。本研究的发现揭示了miR-145-5p对结肠癌发展的抑制作用,miR-145-5p可能是结肠癌治疗的新靶点。

本研究的重点是确认了RAD18在结直肠癌发展中的重要作用,并确定了RAD18的关键上游调控因子,表明miR-145-5p通过靶向抑制RAD18的表达在

结直肠癌中促进NK细胞的杀伤作用。这些发现为深入了解结直肠癌的发病机制提供了更广阔的视角。尽管如此,该研究仍存在局限性。首先,未从动物体内层面验证RAD18在NK细胞对结直肠癌细胞杀伤的抑制作用;另外,RAD18下游调控机制尚未深入探究,拟在未来进行深入挖掘,以期丰富结直肠癌进展中的调控机制。总的来说,本研究不仅丰富了NK细胞在肿瘤中的调控机制,而且为指导NK细胞用于肿瘤免疫治疗奠定了基础,从而为临床改善NK细胞功能提供了一个新的靶点。本研究提示E2F7/RAD18轴可能可以作为结直肠癌潜在新治疗靶点。

本研究通过生物信息学软件分析结直肠癌组织发现RAD18显著上调表达,并富集于NK细胞杀伤信号通路,进一步分析发现RAD18存在上游调控分子miR-145-5p;细胞分子实验验证miR-145-5p靶向抑制RAD18的表达,进而促进NK细胞对结直肠癌细胞的杀伤作用。本研究首次揭示miR-145-5p/RAD18轴对NK细胞功能的影响,研究结果可能有助于研究人员开发新的结直肠癌治疗策略。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al.* Cancer statistics, 2021[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21654.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, GODING SAUER A, *et al.* Colorectal cancer statistics, 2020[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2020, 70(3): 145-164. DOI: 10.3322/caac.21601.
- [3] JOHDI N A, SUKOR N F. Colorectal Cancer Immunotherapy: options and strategies[J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11:1624 [2023-04-30]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01624/full>. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01624.
- [4] FAN A H, WANG B D, WANG X, *et al.* Immunotherapy in colorectal cancer: current achievements and future perspective[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(14): 3837-3849. DOI: 10.7150/ijbs.64077.
- [5] SHEMBREY C, FOROUTAN M, HOLLANDE F. A new natural killer cell-specific gene signature predicting recurrence in colorectal cancer patients[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13:1011247[2023-04-30]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1011247/full>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1011247.
- [6] TANG S, FU H, XU Q, *et al.* miR-20a regulates sensitivity of colorectal cancer cells to NK cells by targeting MICA[J/OL]. *Biosci Rep*, 2019; 39(7): BSR20180695[2023-04-30]. <https://portlandpress.com/biosci/rep/article/39/7/BSR20180695/219246/miR-20a-regulates-sensitivity-of-colorectal-cancer>. DOI: 10.1042/BSR20180695.
- [7] YU R Y, HU Y M, ZHANG S X, *et al.* LncRNA CTBP1-DT-encoded microprotein DDUP sustains DNA damage response signalling to trigger dual DNA repair mechanisms[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(14): 8060-8079. DOI: 10.1093/nar/gkac611.
- [8] LOU P R, ZOU S T, SHANG Z F, *et al.* RAD18 contributes to the migration and invasion of human cervical cancer cells via the interleukin-1 β pathway[J]. *Mol Med Report*, 2019, 20(4): 3415-3423. DOI: 10.3892/mmr.2019.10564.
- [9] ZOU S, YANG J, GUO J, *et al.* RAD18 promotes the migration and invasion of esophageal squamous cell cancer via the JNK-MMPs pathway[J]. *Cancer Lett*, 2018, 417: 65-74. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.12.034.
- [10] XUE H, WU Z H, RAO D D, *et al.* Long non-coding RNA LINC00858 aggravates the oncogenic phenotypes of ovarian cancer cells through miR-134-5p/RAD18 signaling[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2020, 302(5): 1243-1254. DOI: 10.1007/s00404-020-05722-z.
- [11] FANG P P, XIANG L X, CHEN W L, *et al.* LncRNA GAS5 enhanced the killing effect of NK cell on liver cancer through regulating miR-544/RUNX3[J]. *Innate Immun*, 2019, 25(2): 99-109. DOI: 10.1177/1753425919827632.
- [12] HUANG Y, LUO Y, OU W, *et al.* Exosomal lncRNA SNHG10 derived from colorectal cancer cells suppresses natural killer cell cytotoxicity by upregulating INHBC[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):528[2023-04-30]. <https://cancer.cbiomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-021-02221-2>. DOI: 10.1186/s12935-021-02221-2.
- [13] WONG S H, YU J. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(11): 690-704. DOI: 10.1038/s41575-019-0209-8.
- [14] ALLEN J, SEARS C L. Impact of the gut microbiome on the genome and epigenome of colon epithelial cells: contributions to colorectal cancer development[J/OL]. *Genome Med*, 2019, 11(1):11 [2023-05-23]. <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-019-0621-2>. DOI: 10.1186/s13073-019-0621-2.
- [15] YAN X Q, CHEN J, MENG Y, *et al.* RAD18 may function as a predictor of response to preoperative concurrent chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer through caspase-9-caspase-3-dependent apoptotic pathway[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(6): 3094-3104. DOI: 10.1002/cam4.2203.
- [16] LIU R L, DONG Y, DENG Y Z, *et al.* Tumor suppressor miR-145 reverses drug resistance by directly targeting DNA damage-related gene RAD18 in colorectal cancer[J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(7): 5011-5019. DOI: 10.1007/s13277-015-3152-5.
- [17] LI P, HE C, GAO A D, *et al.* RAD18 promotes colorectal cancer metastasis by activating the epithelial-mesenchymal transition pathway[J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(1): 213-223. DOI: 10.3892/or.2020.7590.
- [18] BHAT R, ROMMELAERE J. NK-cell-dependent killing of colon carcinoma cells is mediated by natural cytotoxicity receptors (NCRs) and stimulated by parvovirus infection of target cells[J/OL]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 367[2023-04-30]. <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-13-367>. DOI: 10.1186/1471-2407-13-367.
- [19] LONG S, GU Y, AN Y, *et al.* Reovirus enhances cytotoxicity of natural killer cells against colorectal cancer via TLR3 pathway[J/OL]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 185[2023-04-30]. <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-021-02853-y>. DOI: 10.1186/s12967-021-02853-y.
- [20] STANGL S, TONTCHEVA N, SIEVERT W, *et al.* Heat shock protein 70 and tumor-infiltrating NK cells as prognostic indicators for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck after radiochemotherapy: a multicentre retrospective study of the

- german cancer consortium radiation oncology gro[J]. *Int J Cancer*, 2018, 142(9): 1911-1925. DOI: 10.1002/ijc.31213.
- [21] ZHOU T C, CHEN S, MAO X Y. miR-145-5p affects the differentiation of gastric cancer by targeting KLF5 directly[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 7634-7644. DOI: 10.1002/jcp.27525.
- [22] FAN S, CHEN P, LI S. miR-145-5p Inhibits the proliferation, migration, and invasion of esophageal carcinoma cells by targeting ABRACL[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6692544 [2023-04-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33728339/>. DOI: 10.1155/2021/6692544.
- [23] 邴钟兴, 曹磊, 曹智理, 等. 过表达 miR-145-5p 通过下调 IGF1R 抑制食管鳞状细胞 TE-10 细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(6): 634-639. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.06.007.
- [24] CHANG W W, WANG B Y, CHEN S H, *et al.* miR-145-5p targets Sp1 in non-small cell lung cancer cells and links to BMI1 induced pemetrexed resistance and epithelial-mesenchymal transition[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 15352 [2023-04-30]. <https://doi.org/10.3390/ijms232315352>. DOI: 10.3390/ijms232315352.
- [25] HU Y Y, WU D Q, HUANG R, *et al.* HMGB3 targeted by miR-145-5p impacts proliferation, migration, invasion, and apoptosis of breast cancer cells[J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 1-12. DOI: 10.1155/2022/1954099.
- [26] CHEN Q, ZHOU L, YE X, *et al.* miR-145-5p suppresses proliferation, metastasis and EMT of colorectal cancer by targeting CDCA3[J/OL]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(4): 152872 [2023-04-30]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0344033819325932?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.prp.2020.152872.
- [27] ZHUANG W, NIU T, LI Z. MicroRNA miR-145-5p regulates cell proliferation and cell migration in colon cancer by inhibiting chemokine (C-X-C motif) ligand 1 and integrin $\alpha 2$ [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 9909-9917. DOI: 10.1080/21655979.2021.2000243.
- [收稿日期] 2023-05-03 [修回日期] 2023-08-09
[本文编辑] 郁晓路, 黄静怡