

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.05.008

· 基础研究 ·

miR-433 通过靶向 YAP1 抑制结直肠癌 HCT-116 细胞的干细胞特性并提高其 5-FU 敏感性

董欣敏¹, 郑媿^{2△}, 栗甜甜³, 君梅³, 张剑⁴(1. 内蒙古医科大学附属肿瘤医院 肿瘤内科, 内蒙古 呼和浩特 010000; 2. 内蒙古医科大学附属肿瘤医院 医务科, 内蒙古 呼和浩特 010000; 3. 内蒙古医科大学 研究生院, 内蒙古 呼和浩特 010059; 4. 内蒙古医科大学附属肿瘤医院 放疗科, 内蒙古 呼和浩特 010000)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-433 对结直肠癌(CRC)细胞干细胞特性及 5-氟尿嘧啶(5-FU)耐药性的影响, 并阐明其潜在的分子调控机制。 **方法:** 建立 5-FU 耐药的 HCT-116 细胞株。采用 RT-qPCR 和 WB 法检测 miR-433 及干细胞特性标志物(SOX2、OCT4、Nanog)的表达。通过双萤光素酶报告基因实验、免疫荧光和核质分离实验验证 miR-433 与靶基因 YAP1 的关系及 YAP1 对其亚细胞定位的影响。通过拯救实验确认 miR-433/YAP1 轴的功能。利用 CCK-8 法检测细胞对 5-FU 的敏感性。 **结果:** 与亲代 HCT-116/P 细胞相比, 耐药的 HCT-116 细胞株中 miR-433 表达显著下调($P < 0.05$), 而干细胞特性标志物(SOX2、OCT4、Nanog)表达上调($P < 0.05$)。过表达 miR-433 能够抑制干细胞标志物的表达, 并直接靶向 YAP1, 阻碍其核定位($P < 0.05$)。恢复 YAP1 的表达能够部分逆转 miR-433 对干细胞标志物的抑制作用($P < 0.05$)。功能上, 上调 miR-433 显著增强了 CRC 细胞对 5-FU 的敏感性, 而此效应同样可被 YAP1 的重新表达所削弱($P < 0.05$)。 **结论:** miR-433 通过直接靶向 YAP1 通路, 抑制 CRC 细胞的干细胞特性相关分子表型, 并增强其对化疗药物的敏感性。miR-433/YAP1 轴可能成为克服 CRC 5-FU 耐药的潜在新靶点。

[关键词] 结直肠癌; miR-433; YAP1; 肿瘤干细胞特性; 5-FU 耐药

[中图分类号] R735.3; R730.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 05-0537-08

miR-433 inhibits cancer stem cell-like properties and enhances 5-FU sensitivity by targeting YAP1 in colorectal cancer HCT-116 cells

DONG Xinmin¹, ZHENG Ti^{2△}, LI Tiantian³, JUN Mei³, ZHANG Jian⁴(1. Department of Medical Oncology, The Affiliated Cancer Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010000, Inner Mongolia Autonomous Region, China; 2. Department of Medical Affairs, The Affiliated Cancer Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010000, Inner Mongolia Autonomous Region, China; 3. Graduate School, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China; 4. Department of Radiation Oncology, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010000, Inner Mongolia Autonomous Region, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of microRNA-433 (miR-433) in regulating stemness and chemoresistance in colorectal cancer (CRC) cells and to elucidate the underlying molecular regulatory mechanisms. **Methods:** A 5-FU-resistant HCT-116 cell line was established. The expression levels of miR-433 and stemness markers (SOX2, OCT4, and Nanog) were assessed using RT-qPCR and WB assay. The interaction between miR-433 and its target gene, YAP1, as well as the effect on the subcellular localization of YAP1, were verified through dual-luciferase reporter assays, immunofluorescence staining, and nuclear-cytoplasmic fractionation. Rescue experiments were conducted to confirm the functional role of the miR-433/YAP1 axis. The sensitivity of cells to 5-FU was evaluated using the CCK-8 assay. **Results:** Compared with parental cells, the expression of miR-433 was significantly downregulated in 5-FU-resistant HCT-116 cells ($P < 0.05$), whereas the expression of stemness markers (SOX2, OCT4, and Nanog) was upregulated ($P < 0.05$). Overexpression of miR-433 suppressed the expression of stemness markers, directly targeted YAP1, and inhibited the nuclear translocation of YAP1 ($P < 0.05$). Restoration of the expression of YAP1 partially reversed the inhibitory effect of miR-433 on stemness

[基金项目] 内蒙古自治区自然科学基金(2020LH08036); 内蒙古自治区卫生健康委 2023 年首府地区公立医院高水平临床专科建设科技项目(2023SGGZ114-03); 国家自然科学基金地区科学基金(82460865); 北京大学肿瘤医院内蒙古医院高水平临床专科建设科技项目(12024YNQN009)

[作者简介] 董欣敏, 女, 博士, 主任医师; 郑媿, 女, 硕士生。△为共同第一作者

[通信作者] 张剑(扫码获取作者通信方式)



molecules ($P < 0.05$). Functionally, upregulation of miR-433 significantly enhanced the sensitivity of CRC cells to 5-FU; this effect was attenuated by the re-expression of YAP1 ($P < 0.05$). **Conclusion:** miR-433 suppresses the stem-like molecular phenotype of colorectal cancer cells and enhances sensitivity to chemotherapeutic agents by directly targeting the YAP1 pathway. The miR-433/YAP1 axis may serve as a potential novel therapeutic target for overcoming chemoresistance in CRC.

[Key words] colorectal cancer (CRC); miR-433; YAP1; cancer stemness; 5-FU chemoresistance

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(5): 537-544. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.05.008]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球范围内最常见的消化道恶性肿瘤之一。肿瘤复发、远处转移及化疗耐药是导致治疗失败、患者预后不佳的主要临床挑战^[1]。miRNA 是一类内源性非编码小分子 RNA,可在转录后水平调控靶基因的表达,广泛参与细胞的增殖、分化、凋亡和迁移等多种生理和病理过程^[2-4]。本团队的前期研究^[4]证实,miR-433 在 CRC 组织和细胞中表达显著下调,并且其作为一种抑癌分子,能够有效抑制 CRC 细胞的增殖与迁移能力。Hippo 信号通路是调控器官大小和细胞增殖的关键通路,其下游核心效应分子 Yes 相关蛋白 1 (Yes-associated protein 1, YAP1)的异常激活在多种肿瘤中被证实能够诱导干细胞特性,并促进其对化疗药物的耐药。已有研究^[5]报道,miR-433 可以直接靶向并抑制 YAP1 的表达;而在胃癌等消化系统肿瘤中, YAP1 作为关键癌基因的功能也已被广泛证实^[6-7],这提示 miR-433/YAP1 轴可能在多种肿瘤中扮演重要角色。基于团队前期工作,本研究旨在深入探究 miR-433 在调控 CRC 细胞干细胞特性及 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)敏感性中的作用,并阐明其以 YAP1 为核心的分子调控网络,以期为克服 CRC 的 5-FU 耐药性提供新的理论依据和潜在的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人 CRC 细胞 HCT-116 及人胚肾细胞 HEK-293T 购自中国科学院细胞库,10%胎牛血清及 1%青-链霉素的杜氏改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)、TRIzol 试剂、Lipofectamine 3000 试剂、核蛋白提取试剂盒以及羊抗兔 IgG 购自美国 Thermo Scientific 公司,SOX2 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司,OCT4、Nanog、GAPDH 和 Lamin B1 多抗购自美国 Santa Cruz 公司,YAP1 单克隆抗体购自美国 CST 公司,CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司,化学发光检测试剂盒购自美国 Millipore 公司,PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser、Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit 及 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司,psiCHECK-2 报告基因质粒购自

美国 Promega 公司。HCT-116、HEK-293T 细胞在 DMEM 中,于 37 °C、5% CO₂的培养箱中培养;5-FU 购自德国 Sigma 公司,使用时将 5-FU 粉末溶解于二甲基亚砜中,配制成浓度为 100 mmol/L 的母液无菌分装后于 -20 °C 避光保存。在进行体外细胞实验前,使用完全细胞培养基将 5-FU 母液稀释至实验所需的最终工作浓度。

miR-433 mimic 及其阴性对照(NC mimic)、miR-433 inhibitor 及其阴性对照(inhibitor NC)均购自上海吉玛制药技术有限公司。包含 YAP1 完整编码区但不含 3'-UTR 的过表达质粒(pcDNA3.1-YAP1)由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 建立 5-FU 诱导的耐药细胞株 HCT-116/R

为建立 5-FU 耐药的 HCT-116 细胞株(HCT-116/R),将亲代 HCT-116 细胞(HCT-116/P)置于含 0.5 μmol/L 5-FU 的培养基中持续培养 48 h。随后更换为无药的新鲜完全培养基继续培养。待存活细胞克隆逐渐恢复生长,汇合度达 80% 后(此过程约需 1~2 周)进行传代。将 5-FU 浓度依次调整至 1.0、2.0、5.0、10.0 μmol/L 进行筛选,在每一浓度梯度的 5-FU 中维持培养至少 2~3 周(或连续传代 3~5 次),直至细胞形态恢复正常且生长动力学稳定(细胞存活率 > 90%)。此过程反复进行,最终获得能在含 10 μmol/L 5-FU 的培养基中稳定增殖(细胞存活率 > 90%)的 HCT-116/R 细胞。

1.3 RNA 提取与 RT-qPCR

使用 TRIzol 试剂分别提取 HCT-116/P 与 HCT-116/R 细胞总 RNA。使用分光光度计测定 RNA 浓度及纯度,确保 A260/A280 比值在 1.8~2.0,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,观察到清晰的 28S 和 18S 条带以确认 RNA 完整性。对于 mRNA 和 miRNA 的检测,分别使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 和 Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis Kit 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。随后,采用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒在 Applied Biosystems 7500 实时 PCR 系统上进行 RT-qPCR,20 μL 扩增体系:SYBR Premix Ex Taq II (2×) 10 μL,上下游引物各 0.8 μL (10 μmol/L),ROX Reference Dye II 0.4 μL,cDNA 模板 2 μL,ddH₂O 6 μL。反应条件:预变性 95 °C 30 s;扩增 40 个循环(95 °C 5 s,60 °C 34 s);最后进行熔解曲线分析(95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s)。数据

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析, mRNA以内参GAPDH校正, miRNA以内参U6 snRNA校正。

1.4 质粒、寡核苷酸与细胞转染

本研究过表达实验涉及的细胞转染分组如下, NC mimic组(转染NC阴性对照模拟物)、miR-433 mimic组(转染miR-433模拟物)、NC inhibitor组(转染阴性对照抑制物)、miR-433 inhibitor组(转染miR-433抑制物)、miR-433 mimic + 空载体组(共转染miR-433模拟物与空载体)、miR-433 mimic + YAP1组(共转染miR-433模拟物和YAP1过表达质粒)。

按照上述分组,使用Lipofectamine 3000试剂进行细胞转染,对于单转染组,每孔使用1.5 μL Lipofectamine 3000与500 ng质粒(需加入1 μL P3000试剂)或15 pmol miRNA mimic/inhibitor(终浓度约30 nmol/L,不加P3000)混合。对于共转染组(拯救实验),将500 ng YAP1质粒与15 pmol miR-433 mimic同时加入含1 μL P3000的Opti-MEM培养基中,再与1.5 μL Lipofectamine 3000混合形成复合物。室温结合15 min后滴加至细胞。

1.5 WB法检测HCT-116/P与HCT-116/R细胞中SOX2、OCT4、Nanog、GAPDH蛋白的表达

使用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液分别提取HCT-116/P与HCT-116/R细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。取等量蛋白经SDS-PAGE分离后,转至PVDF膜上。用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,随后加入SOX2(1:500)、OCT4(1:500)、Nanog(1:500)或GAPDH(1:1000)4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜。次日,用HRP标记的兔抗鼠IgG室温反应1 h,最后用Millipore化学发光检测试剂盒进行显影,在化学发光成像系统上显色、曝光并采集信号。

1.6 miR-433靶向YAP1 3'-UTR的双萤光素酶报告基因验证实验

将TargetScan数据库(<http://www.targetscan.org>)预测的含miR-433结合位点的YAP1 3'-UTR野生型(wild-type, WT)序列或其突变型(mutant, MUT)序列克隆至psiCHECK-2报告质粒的海肾萤光素酶基因下游。将构建好的报告质粒与miR-433 mimic或NC mimic共转染至HEK-293T细胞中。实验分为四组, WT + NC mimic组(共转染YAP1 3'-UTR野生型质粒与NC mimic)、WT + miR-433 mimic组(共转染YAP1 3'-UTR野生型质粒与miR-433 mimic)、MUT + NC mimic组(共转染YAP1 3'-UTR突变型质粒与NC mimic)、MUT + miR-433 mimic组(共转染YAP1 3'-UTR突变型质粒与miR-433 mimic)。转染48 h后,使用Promega双萤光素酶报告基因检测试剂盒检测海肾和萤火虫萤光素酶的活性。

1.7 免疫荧光染色法分析miR-433过表达对HCT-116细胞中YAP1蛋白定位的影响

将HCT-116/R细胞以 2×10^4 个/孔的密度接种于置于24孔板中的无菌盖玻片上,培养至汇合度达50%~60%时进行转染处理。随后用PBS洗涤,经4%多聚甲醛室温固定15 min, PBS洗涤3次后用0.5% Triton X-100室温通透20 min。随后用5%牛血清白蛋白室温封闭1 h。吸去封闭液,滴加兔抗YAP1单克隆抗体(1:100)于4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中反应过夜。次日PBS洗涤3次,滴加Alexa Fluor 488标记的山羊抗兔IgG(1:500),室温避光反应1 h。最后用含DAPI的封片剂封片。在Leica激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.8 核质蛋白提取

严格按照试剂盒的说明书分离并提取转染了NC mimic或miR-433 mimic的HCT-116细胞的核蛋白与细胞质蛋白。收集细胞沉淀,依次加入胞质提取试剂CER I和CER II提取胞质蛋白;向沉淀中加入核提取试剂,剧烈振荡,提取核蛋白。将分离出的胞质蛋白、核蛋白分别进行SDS-PAGE和转膜。使用GAPDH(1:1 000)作为细胞质内参,使用Lamin B1(1:1 000)作为细胞核内参,检测YAP1蛋白在细胞核、细胞质中的相对表达水平,以验证核质分离效率及YAP1的定位变化。

1.9 CCK-8法检测miR-433水平对HCT-116细胞5-FU耐药性的影响

将HCT-116细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于96孔板。转染24 h后,加入含梯度浓度5-FU(0、0.5、1、5、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$,每组设5个复孔)的培养基继续培养48 h。每孔加入10 μL CCK-8试剂,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育2 h。随后,在Tecan F50酶标仪上测定450 nm波长处的光密度(D)值。计算细胞存活率及半数抑制浓度(IC_{50}),计算公式:细胞存活率 = $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白孔}}) / (D_{0 \mu\text{mol/L对对照组}} - D_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

1.10 统计学处理

所有实验均独立重复至少3次。数据使用GraphPad Prism 8软件进行分析,并以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用Student's t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

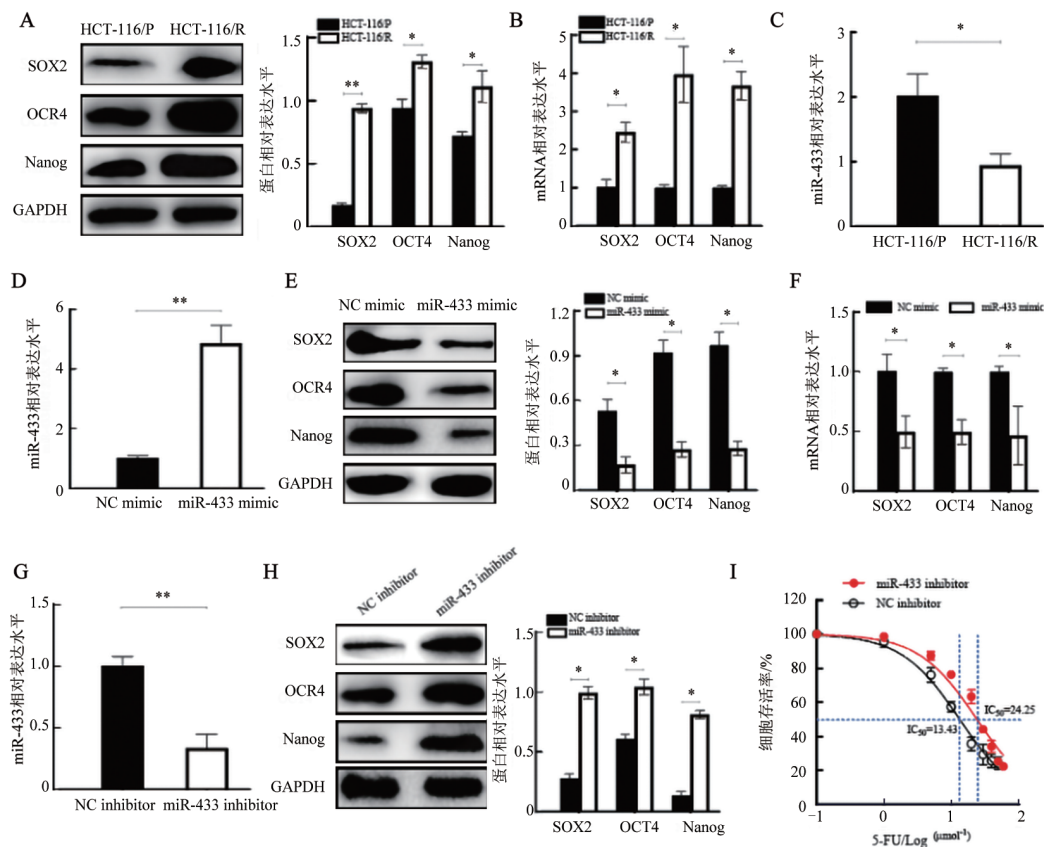
2.1 miR-433在HCT-116/R细胞中表达下调且其过表达抑制肿瘤干细胞分子表型

WB和RT-qPCR结果显示,与HCT-116/P相比, HCT-116/R细胞株中核心干细胞特性标志物SOX2、

OCT4和Nanog的蛋白及mRNA水平均显著上调(图1A、B, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。RT-qPCR检测miR-433在这些细胞中的表达,结果显示,HCT-116/R细胞中的miR-433水平相较于HCT-116/P细胞显著降低(图1C, $P < 0.05$)。

在HCT-116/P细胞中转染miR-433 mimic以模拟其过表达状态(图1D, $P < 0.01$),结果显示,与NC mimic组的细胞相比,过表达miR-433能够显著抑制内源性SOX2、OCT4和Nanog的蛋白及mRNA表达

水平(图1E、F, $P < 0.05$)。使用miR-433 inhibitor处理HCT-116/R细胞以敲低miR-433内源性表达,RT-qPCR分析证实,inhibitor组的miR-433水平被有效下调(图1G, $P < 0.05$)。与过表达实验的结果相反,WB法检测结果显示,抑制miR-433导致了其下游干细胞特性标志物SOX2、OCT4和Nanog蛋白表达的显著上调(图1H, $P < 0.01$)。CCK-8法检测结果表明,敲低miR-433后,5-FU对HCT-116/R细胞的 IC_{50} 值升高(图1I)。



A、B: WB法(A)和RT-qPCR(B)检测HCT-116/P与HCT-116/R细胞中SOX2、OCT4和Nanog蛋白mRNA的相对表达水平; C: RT-qPCR检测HCT-116/P与HCT-116/R细胞中miR-433的相对表达水平; D: RT-qPCR检测NC mimic组、miR-433 mimic组HCT-116/P细胞中miR-433相对表达水平; E、F: 在HCT-116细胞中转染NC mimic或miR-433 mimic 48 h后, WB法(E)和RT-qPCR(F)检测SOX2、OCT4和Nanog蛋白及mRNA的相对表达; G: 在HCT-116/P细胞中转染NC inhibitor或miR-433 inhibitor 48 h后, RT-qPCR检测miR-433的相对表达水平; H: 在HCT-116/R细胞中转染inhibitor NC或miR-433 inhibitor 48 h后, WB法检测SOX2、OCT4、Nanog的蛋白表达; I: CCK-8法检测转染NC inhibitor或miR-433 inhibitor的HCT-116/R细胞对梯度浓度5-FU的敏感性。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图1 miR-433在HCT-116/R细胞中表达下调并抑制干细胞标志物的表达

2.2 YAP1是miR-433在HCT-116细胞中的直接作用靶点

双荧光素酶报告基因实验验证miR-433与YAP1的靶向关系,实验结果显示,在HEK-293T细胞中,共转染miR-433 mimic和YAP1-WT质粒显著抑制了荧光素酶的活性,而当YAP1 3'-UTR上的结合位点被突变后,这种抑制作用则完全消失($P < 0.05$,图2A)。

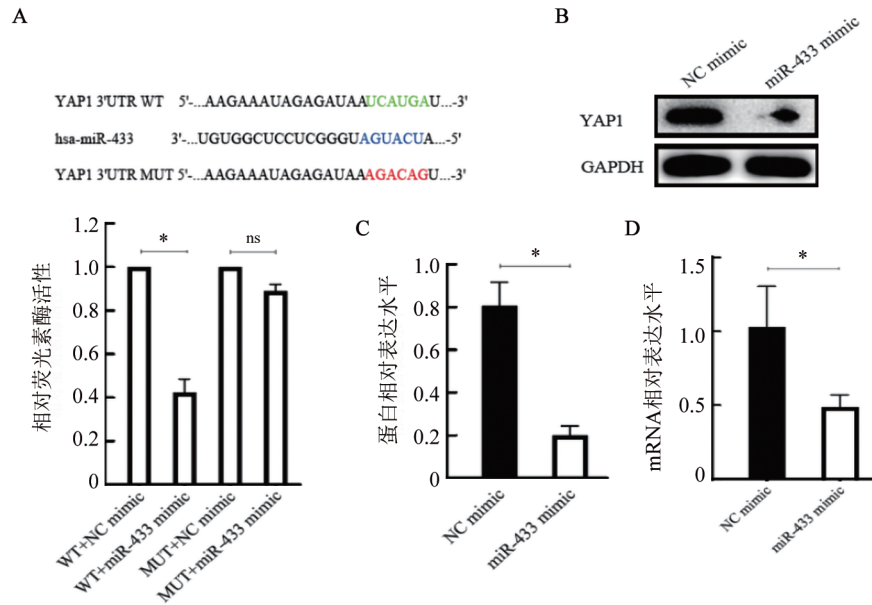
此外,在HCT-116细胞中过表达miR-433后,通过WB和RT-qPCR检测内源性YAP1的表达变化。结果一致地显示,上调miR-433能够显著降低YAP1的蛋白和mRNA水平($P < 0.05$,图2B~D)。

2.3 miR-433通过抑制YAP1的核定位来阻断其功能

免疫荧光实验观察miR-433对YAP1亚细胞定位的影响,结果显示,在NC mimic组中,YAP1(绿色荧

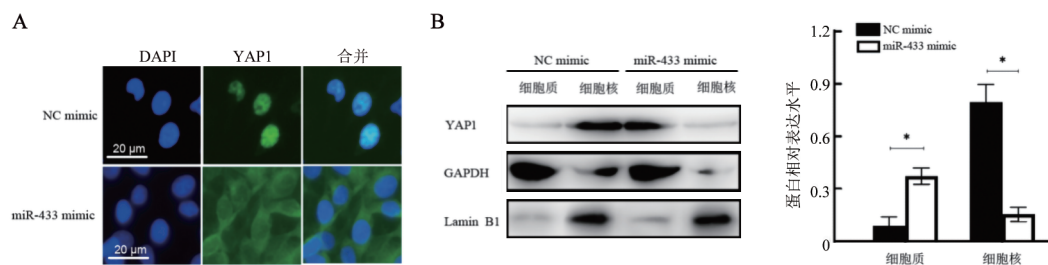
光)主要定位于细胞核内,与DAPI染色的细胞核(蓝色荧光)高度重合;而在转染了miR-433 mimic的细胞中,YAP1则更多地滞留在细胞质中,核内信号显著减弱(图3A)。为了进一步量化验证这一现象,进

行核质蛋白分离实验,WB法检测结果显示,与NC mimic组相比,过表达miR-433导致YAP1在细胞核组分中的含量显著减少,而在细胞质组分中的含量相应增加(图3B, $P < 0.05$)。



A: 上方为miR-433与YAP1 mRNA 3'-UTR WT及YAP1 mRNA 3'-UTR MUT结合位点示意图,下方为双萤光素酶报告基因实验结果;B: WB检测转染NC mimic或miR-433 mimic后,HCT-116细胞中YAP1蛋白的表达;C:转染NC mimic或miR-433 mimic后YAP1蛋白条带的定量分析;D: RT-qPCR检测转染NC mimic或miR-433 mimic后,HCT-116细胞中YAP1 mRNA的相对表达水平。* $P < 0.05$ 。

图2 miR-433靶向YAP1 3'-UTR并抑制其表达



A: 免疫荧光染色示NC mimic或miR-433 mimic转染后YAP1(绿色,Alexa Fluor 488标记)及细胞核(蓝色,DAPI染色)的亚细胞定位;B:核质分离后WB检测细胞核与细胞质组分中YAP1的蛋白水平。Lamin B1作为核内参,GAPDH作为胞质内参。* $P < 0.05$ 。

图3 miR-433抑制YAP1的核定位

2.4 YAP1表达逆转miR-433对CRC干细胞标志物的抑制作用

在过表达miR-433的HCT-116细胞中同时共转染一个不含3'-UTR的YAP1过表达质粒。WB结果显示,单独过表达miR-433(miR-433 mimic组)能够如预期般下调YAP1及干细胞特性标志物SOX2、OCT4和Nanog的水平;当YAP1的表达被外源性质粒恢复后(miR-433 mimic+YAP1过表达质粒组),由miR-433引起的SOX2、OCT4和Nanog蛋白水平的下

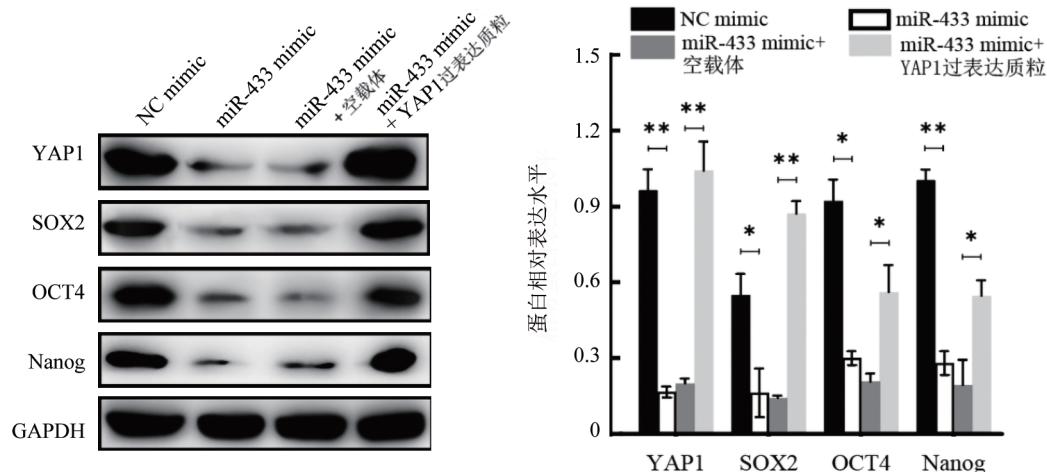
降也得到了显著的逆转(图4, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.5 miR-433通过靶向YAP1增强HCT-116细胞对5-FU的敏感性

拯救实验中,通过CCK-8法检测各组HCT-116细胞在梯度浓度5-FU处理下的存活率,如图5A所示,与NC mimic组相比,5-FU杀伤miR-433 mimic组细胞的 IC_{50} 值显著升高。而miR-433 mimic+YAP1过表达质粒组细胞的5-FU耐药能力得到了显著的恢复,其存活曲线左移,接近NC mimic组。为了

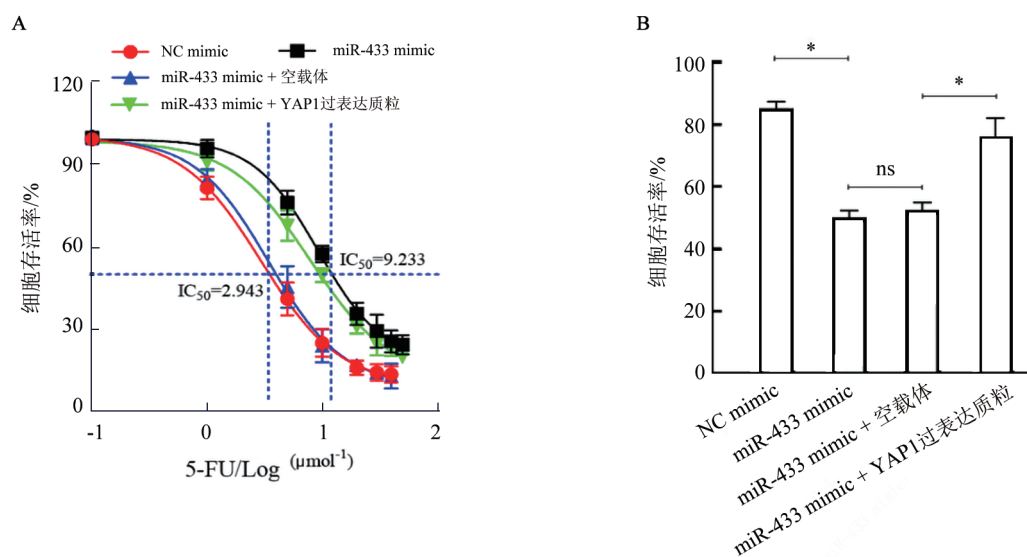
更直观地进行统计学比较,本研究选取了接近 IC_{50} 值的 5-FU 浓度(3 $\mu\text{mol/L}$)进行分析。如图 5B 所示,在 3 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-FU 处理下,miR-433 mimic 组细胞存

活率较 NC mimic 组显著下降($P < 0.05$),恢复 YAP1 表达可逆转上述作用,使细胞存活率显著回升($P < 0.05$)。



WB 检测在不同处理组中, YAP1、SOX2、OCT4 和 Nanog 的蛋白表达水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 YAP1 过表达拯救 miR-433 对 HCT-116 细胞干细胞标志物表达的抑制作用



A: 不同处理组细胞在梯度浓度 5-FU 作用下的细胞存活率曲线; B: 在 3 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU 处理下, 拯救实验各组细胞存活率柱状图。组间比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 miR-433 通过 YAP1 通路增强 HCT-116 细胞的 5-FU 敏感性

3 讨论

CRC 的 5-FU 耐药是导致治疗失败的核心难题, 而肿瘤干细胞的存续被认为是其根本原因。团队前期证实 miR-433 为 CRC 抑癌基因的基础上^[4], 本研究进一步从肿瘤干细胞特性的角度, 深入揭示其全新的作用机制。研究的核心发现是, miR-433 通过直接靶向 Hippo 通路的关键分子 YAP1, 有效抑制了 CRC 细胞的干细胞标志物表达, 并最终逆转其对 5-FU 的耐药。

本研究始于一个关键的临床相关模型——5-FU 耐药细胞株。通过梯度浓度 5-FU 诱导, 团队成功筛选出具有显著干细胞特性的 HCT-116/R 耐药细胞, 其干细胞特性标志物 SOX2、OCT4 等高表达。在此模型中, 本研究发现 miR-433 的表达显著下调, 表明 miR-433 的缺失与该细胞株的干细胞特性及耐药性密切相关。此外, 多项临床数据分析^[8-9]也表明, 低表达的 miR-433 与 CRC 的分期和复发存在关联, 而早期复发通常预示着更强的 5-FU 耐药性。这为本研究的体外发现提供了重要的临床佐证。功能获得与功

能缺失的双向验证实验共同证明,miR-433通过负向调控YAP1,抑制干细胞特性并逆转5-FU耐药。

本研究鉴定并验证了miR-433-YAP1-干细胞标志物信号通路。首先,双萤光素酶报告基因实验清晰地证明,miR-433通过与YAP1 mRNA 3'-UTR区域的特异性结合位点结合来抑制其表达。其次,拯救实验表明,恢复YAP1的表达能够逆转由miR-433过表达引起的干细胞标志物SOX2和OCT4的下调。进一步的研究^[10]发现,YAP1并非直接作为转录因子结合到SOX2的启动子上,而是通过与核心干细胞特性因子OCT4形成蛋白复合物,共同作为转录激活复合体,驱动SOX2的表达。这一发现为YAP1调控干细胞特性提供了一个精细的分子机制解释,阐明了该信号轴的内在联系。

值得注意的是,本研究观察到YAP1核内水平下降,但尚不能明确是其总蛋白量减少还是存在独立调控核定位的机制。YAP1的亚细胞定位调控网络极为复杂,其入核过程远不止经典的Hippo/LATS通路调控。大量研究^[11]表明,多种不依赖于LATS激酶的机制在YAP1的核质穿梭中发挥重要作用。例如,Src家族激酶介导的酪氨酸磷酸化(YAP1的Y357位点)能够促进其核定位,且该过程独立于LATS介导的丝氨酸磷酸化^[12-13]。此外,Nemo样激酶(NLK)对YAP1的Ser128位点的磷酸化,能够阻断其与细胞质滞留蛋白14-3-3的结合,同样促进其入核^[14-15]。更有研究^[16]表明,肌动蛋白细胞骨架的完整性对于YAP1的核定位也至关重要。因此,本研究不能排除miR-433在直接下调YAP1表达的同时,还可能通过靶向这些非经典调控网络中的其他关键节点,协同地、多途径地阻碍YAP1入核。尽管深入探究这些潜在的平行调控通路超出了本研究的范围,但这一可能性为后续研究提供了明确的机制切入点。

除了miR-433,其他miRNA如miR-375和miR-149-5p也参与调控YAP1^[17-18]。本研究与miR-375的研究类似,两者均被证实为肿瘤抑制因子,通过直接靶向YAP1的3'-UTR来下调其表达,从而发挥抑癌功能。然而,不同miRNA对YAP1的调控机制存在显著差异。一个典型的例子是miR-149-5p,在某些肿瘤中,它并非直接靶向YAP1,而是通过靶向Hippo通路的上游核心激酶MST1和SAV1,间接地影响YAP1的活性^[19]。这种上游调控与miR-433的直接靶向效应形成了鲜明对比,揭示了细胞内调控网络的复杂性和多层次性。

本研究也存在一定的局限性。所有实验均在体外细胞模型中完成,其在体内的作用机制仍有待通过构建免疫缺陷小鼠皮下成瘤模型或患者来源异种

移植模型进一步验证。此外,导致miR-433在CRC中表达下调的上游调控机制(如启动子甲基化或长链非编码RNA的调控)也值得未来深入探索^[20-21]。

综上所述,本研究在前期工作的基础上,揭示了miR-433作为HCT-116细胞干细胞特性的关键负向调控因子,通过直接靶向并抑制YAP1的核定位及其功能,下调干细胞标志物表达,增强细胞对化疗药物的敏感性。这些发现不仅可以深化对HCT-116细胞5-FU耐药机制的理解,也为开发靶向CRC的治疗新策略提供了有力的实验依据和崭新的视角。

[参考文献]

- [1] LIU W X, JIANG C, LI J X. Current status and advances in the treatment of colorectal cancer with liver metastases[J]. *World J Clin Oncol*, 2025, 16(7):107438. DOI:10.5306/wjco.v16.i7.107438.
- [2] LIN H H, ZHOU J, HE Y, et al. microRNA: role in macrophage polarisation and colorectal cancer pathogenesis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2025, 13: 1619526. DOI:10.3389/fcell.2025.1619526.
- [3] ZHANG J, ZHANG L, ZHANG T, et al. Reduced miR-433 expression is associated with advanced stages and early relapse of colorectal cancer and restored miR-433 expression suppresses the migration, invasion and proliferation of tumor cells *in vitro* and in nude mice[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7579-7588. DOI: 10.3892/ol.2018.8275.
- [4] 张剑,张彤,王宏伟,等. 上调miR-433表达抑制结直肠癌细胞系增殖[J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(08): 1127-1132. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2021.08.011
- [5] RANMALE S, KUMAR P, TONGAONKAR H, et al. Chemotherapy-induced alterations in miRNA expression and their prognostic implications in ovarian cancer[J]. *Front Oncol*, 2025, 15: 1580565. DOI:10.3389/fonc.2025.1580565.
- [6] SONG S M, FAN Y B, ZOU G Y, et al. KAP1 promotes gastric adenocarcinoma progression by activating Hippo/YAP1 signaling *via* binding to HNRNPAB[J]. *Cancer Lett*, 2025, 621: 217695. DOI: 10.1016/j.canlet.2025.217695.
- [7] DU F C, YU C, LI R, et al. Expression of miR-141 and YAP1 in gastric carcinoma and modulation of cancer cell proliferation and apoptosis[J]. *Int J Clin Exp Pathol* 2019, 12(2): 559-567. PMID: 31933860.
- [8] LI H M, LI J F, YANG T S, et al. microRNA-433 represses proliferation and invasion of colon cancer cells by targeting homeobox A1[J]. *Oncol Res*, 2018, 26(2): 315-322. DOI: 10.3727/096504017x15067856789781.
- [9] LUO H C, ZHANG H B, ZHANG Z Z, et al. Down-regulated miR-9 and miR-433 in human gastric carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28(1): 82. DOI:10.1186/1756-9966-28-82.
- [10] BORA-SINGHAL N, NGUYEN J, SCHAAL C, et al. YAP1 regulates OCT4 activity and SOX2 expression to facilitate self-renewal and vascular mimicry of stem-like cells[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(6): 1705-1718. DOI:10.1002/stem.1993.
- [11] KIM T, HWANG D, LEE D, et al. MRTF potentiates TEAD-YAP transcriptional activity causing metastasis[J]. *EMBO J*, 2017, 36(4):

- 520-535. DOI:10.15252/embj.201695137.
- [12] SUGIHARA T, WERNEBURG N W, HERNANDEZ M C, et al. YAP tyrosine phosphorylation and nuclear localization in cholangiocarcinoma cells are regulated by LCK and independent of LATS activity[J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(10): 1556-1567. DOI: 10.1158/1541-7786.mcr-18-0158.
- [13] SMOOT R L, WERNEBURG N W, SUGIHARA T, et al. Platelet-derived growth factor regulates YAP transcriptional activity *via* Src family kinase dependent tyrosine phosphorylation[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 824-836. DOI:10.1002/jcb.26246.
- [14] HONG A W, MENG Z P, YUAN H X, et al. Osmotic stress-induced phosphorylation by NLK at Ser128 activates YAP[J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(1): 72-86. DOI:10.15252/embr.201642681.
- [15] MOON S, KIM W, KIM S, et al. Phosphorylation by NLK inhibits YAP-14-3-3-interactions and induces its nuclear localization[J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(1): 61-71. DOI:10.15252/embr.201642683.
- [16] DAS A, FISCHER R S, PAN D J, et al. YAP nuclear localization in the absence of cell-cell contact is mediated by a filamentous actin-dependent, myosin II - and phospho-YAP-independent pathway during extracellular matrix mechanosensing[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(12): 6096-6110. DOI:10.1074/jbc.m115.708313.
- [17] NISHIKAWA E, OSADA H, OKAZAKI Y, et al. miR-3751s activated by ASH1 and inhibits YAP1 in a lineage-dependent manner in lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(19): 6165-6173. DOI:10.1158/0008-5472.can-11-1020.
- [18] DENG M H, XU Y F, YAO Y W, et al. Circular RNA hsa_circ_0051246 acts as a microRNA-375 sponge to promote the progression of gastric cancer stem cells *via* YAP1[J]. *PeerJ*, 2023, 11: e16523. DOI:10.7717/peerj.16523.
- [19] XU M M, XIAO J, CHEN M, et al. miR-149-5p promotes chemotherapeutic resistance in ovarian cancer *via* the inactivation of the Hippo signaling pathway[J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(3): 815-827. DOI:10.3892/ijo.2018.4252.
- [20] XU W J, WU L, LU H, et al. LncRNA PCGEM1 promotes colorectal cancer cell proliferation and migration in positive feedback loop through PCGEM1/miR-433-3p/CTCF axis[J]. *Pathol Res Pract*, 2022, 237: 154017. DOI:10.1016/j.prp.2022.154017.
- [21] HERNÁNDEZ R, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ E, MELGUIZO C, et al. Downregulated microRNAs in the colorectal cancer: diagnostic and therapeutic perspectives[J]. *BMB Rep*, 2018, 51(11): 563-571. DOI: 10.5483/bmbrep.2018.51.11.116.

[收稿日期] 2025-12-07

[修回日期] 2026-01-29

[本文编辑] 苏念