DOI:10.16016/j.2097-0927.202504078

miR-543/SNTB1轴调控结直肠癌免疫微环境

张 敏[1],李 敏[1],肖 猛[1],陈 才[2],郑小菊[1,3],雷雨广[1,3] 信阳职业技术学院:[1]医学院,[2]药学院,河南信阳;[3]信阳市中医院病理科,河南信阳

[摘要] **目的** 探讨miR-543/互养蛋白β1(syntrophin beta 1,SNTB1)轴在结直肠癌(colorectal cancer,CRC)中的临床意义及其对免疫微环境的影响。**方法** 收集癌症基因组图谱(the Cancer Genome Atlas,TCGA)、基因型组织表达(Genotype-Tissue Expression,GTEx)、人类蛋白质图谱(Human Protein Atlas,HPA)等公开数据对CRC组织中*SNTB1*的表达进行分析,并通过Kaplan-Meier生存分析、单因素Cox回归分析及相关性分析评估*SNTB1*在CRC患者中的预后价值及其与免疫微环境的关系。在线数据库结合CRC细胞HT-29荧光活性实验检测miR-543与SNTB1的靶向关系。CRC细胞HT-29经过相应处理后(转染si-SNTB1、miR-543 mimics或/和*SNTB1*过表达质粒)与$CD8^+$ T细胞构建体外共培养体系,分别采用RT-qPCR、Western blot、流式细胞术、ELISA以及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)释放实验检测*miR-543*、*SNTB1*的表达以及$CD8^+$ T细胞的活性及细胞毒性。**结果** 对公共数据库的分析显示*SNTB1*在CRC中的表达显著高于正常组织($P<0.001$);相较于*SNTB1*低表达组,*SNTB1*高表达的患者预后较差($P<0.05$)。SNTB1高表达与CRC肿瘤微环境免疫评分以及$CD8^+$ T细胞等免疫细胞的浸润呈负相关关系($P<0.05$),且在HT-29细胞中敲减*SNTB1*可增强$CD8^+$ T细胞的杀伤力($P<0.01$)。在线数据库结合细胞实验证实了miR-543和SNTB1的靶向结合关系,同时miR-543在CRC中表达降低($P<0.001$)。转染miR-543 mimic可抑制HT-29细胞中SNTB1的表达($P<0.001$),而过表达*SNTB1*可逆转miR-543 mimic对$CD8^+$ T细胞体外杀伤能力的促进效应($P<0.05$)。**结论** miR-543可通过与SNTB1的靶向结合促进$CD8^+$ T细胞的活化并增强其对HT-29细胞的杀伤力。

[关键词] miR-543;结直肠癌;互养蛋白β1;肿瘤免疫微环境
[中图法分类号] R394.3;R730.23;R735.35 [文献标志码] A

MiR-543/SNTB1 axis modulates immune microenvironment in colorectal cancer

ZHANG Min[1], LI Min[1], XIAO Meng[1], CHEN Cai[2], ZHENG Xiaoju[1,3], LEI Yuguang[1,3] [1]School of Medicine, [2]School of Pharmaceutical Sciences, Xinyang Vocational and Technical College, Xinyang, Henan; [3]Department of Pathology, Xinyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinyang, Henan, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the clinical significance of the miR-543/syntrophin beta 1 (SNTB1) axis in colorectal cancer (CRC) and its influence on the tumor immune microenvironment. **Methods** The expression of *SNTB1* in CRC tissues was analyzed using public data, such as, The Cancer Genome Atlas (TCGA), Genotype-Tissue Expression (GTEx), and Human Protein Atlas (HPA). Then Kaplan-Meier survival analysis, univariate Cox regression analysis and correlation analysis were performed to evaluate the prognostic value of *SNTB1* and its relationship with immune microenvironment in CRC. The targeting relationship between *miR-543* and *SNTB1* was confirmed through online databases and fluorescence assays in HT-29 cells. For *in vitro* experiments, after transfecting si-SNTB1, miR-543 mimics and/or *SNTB1* overexpression plasmids, HT-29 cells were co-cultured with $CD8^+$ T cells, the expression of miR543 and

[基金项目] 河南省卫健委医学研究项目(WJLX2023248)
[通信作者] 张 敏,E-mail:470361625@qq.com

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
引用格式:张敏,李敏,肖猛,等.miR-543/SNTB1轴调控结直肠癌免疫微环境[J].陆军军医大学学报,2025,47(13):1484-1493.DOI:10.16016/j.2097-0927.202504078.
Citation:ZHANG M,LI M,XIAO M,*et al*.MiR-543/SNTB1 axis modulates immune microenvironment in colorectal cancer[J].J Army Med Univ,2025,47(13):1484-1493.DOI:10.16016/j.2097-0927.202504078.

SNTB1 and the viability and cytotoxicity of $CD8^+$ T cells were assessed with qRT-PCR, Western blotting, flow cytometry, ELISA, and lactate dehydrogenase (LDH) release assay. **Results** Analysis of public databases revealed significantly higher expression of *SNTB1* in CRC tissues than normal tissues ($P<0.001$). The CRC patients with high *SNTB1* expression exhibited poorer prognosis when compared with those with low expression level ($P<0.05$). Moreover, high *SNTB1* expression was negatively correlated with immune scores in the tumor microenvironment and immune cell infiltration, especially $CD8^+$ T cells ($P<0.05$). Furthermore, Knockdown of *SNTB1* in HT-29 cells enhanced the cytotoxic activity of $CD8^+$ T cells ($P<0.01$). Online database and *in vitro* experiments confirmed that miR-543 targets *SNTB1*, while the expression of miR-543 was decreased in colorectal cancer ($P<0.001$). Transfection with the miR-543 mimic inhibited the expression of *SNTB1* in HT-29 cells ($P<0.001$), while overexpressing *SNTB1* counteracted the promotion effect of miR-543 mimics on $CD8^+$ T cell-mediated cytotoxicity ($P<0.05$). **Conclusion** MiR-543 activates $CD8^+$ T cells and enhances their cytotoxicity against HT-29 cells by directly targeting SNTB1.

[**Key words**] miR-543; colorectal cancer; *SNTB1*; tumor immune microenvironment

Supported by the Medical Scientific Research Project of Health Commission of Henan Province (WJLX2023248). Corresponding author: ZHANG Min, E-mail: 470361625@qq.com

据2022年中国癌症发病情况统计显示结直肠癌(colorectal cancer,CRC)的发病率和死亡率均位列前五,给公共卫生带来了重大挑战[1]。随着癌症研究的深入,肿瘤微环境这一领域逐渐成为研究者关注的焦点。研究表明,肿瘤细胞与其微环境中的免疫细胞发生相互作用,形成复杂的免疫逃逸机制,从而促进肿瘤的转移和耐药性[2-3]。因此寻找新的生物标志物和治疗靶点,对肿瘤的个性化诊疗和改善预后具有重要的临床意义。互养蛋白β1(syntrophin beta1,SNTB1)是Syntrophin基因家族的一个成员,其编码蛋白质为一种衔接蛋白,可为细胞的跨膜信号转导提供平台[4]。研究发现,*SNTB1*与CRC的进展密切相关,例如CRC组织中可检测到*SNTB1*的表达明显升高,且高表达*SNTB1*的患者预后较差;同时细胞实验和裸鼠移植瘤实验证实*SNTB1*可能通过负调控PKN2激活ERK/AKT信号,进而促进CRC的进展[5]。在结肠腺癌中,*SNTB1*可通过调控SRC激活Hippo-YAP信号促进癌细胞的侵袭转移[6]。然而这些研究多是从细胞功能学的角度探索*SNTB1*在CRC中的作用,并聚焦于其下游调控机制[5-7],尚无具体论著说明*SNTB1*是否对肿瘤微环境产生影响。基于此,本研究采用生物信息学结合实验验证的方式分析了*SNTB1*与CRC进展及患者预后的关系,同时探索了其上游可能的调控靶点以及二者对CRC肿瘤微环境和$CD8^+$ T细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

酶标仪(xMark)、Western blot小型垂直电泳转印系统购自美国Bio-Rad公司;流式细胞仪(Accuri™ C6 Plus)购自美国BD公司;实时定量PCR系统(ABI7500)购自美国Thermo公司;DMEM细胞培养液及胎牛血清购自南京生航生物公司;EasySep人$CD8^+$T细胞正选试剂盒(17853)购自北京诺为生物公司;Dynabeads人T活化剂CD3/CD28(11161D)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;Lipofectamine™ 3000及相关转染试剂购于美国Invitrogen公司;TRIzol试剂(KGF5101)购自江苏凯基生物公司;SNTB1(ab242046)、β-actin(ab8227)及HRP标记二抗(ab6721)购自美国Abcam公司;CD69-PE流式抗体(310905)、CD25-APC流式抗体(302609)购自美国BioLegend公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒(11402ES60)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)细胞毒性检测试剂盒(40209ES76)购自上海翌圣生物公司;人TNF-α(EK182)、INF-γ(EK180)、IL-2(EK102)的ELISA Kit检测试剂盒购自杭州联科生物公司;SYBR Premix ExTaq™ Ⅱ试剂盒购自日本TaKaRa公司;miR-543 mimics及对照阴性miR(miR-543和miR-NC)、野生型及突变型*SNTB1*基因3′UTR-荧光素酶表达载体(SNTB1-WT和SNTB1-MUT)、SNTB1小分子干扰RNA及其对照siRNA(si-SNTB1和si-NC)的构建和合成由湖北百奥斯生物公司提供;SNTB1表达质粒及其对照质粒(SNTB1和Ne)购自上海Origene公司。

1.2 公共数据库数据获取及分析

由基于基因表达水平值的交互式分析平台(Gene Expression Profiling Interactive Analysis,GEPIA)数据库在线获取人体各组织器官中*SNTB1*表达的交互式图谱;收集并下载癌症基因组图谱(the Cancer Genome Atlas,TCGA)数据库中CRC项目下miRNA-seq、RNA-seq数据以及患者相应的临床数据,同时收集基因型组织表达(Genotype-Tissue Expression,GTEx)数据库中正

常结直肠组织样本的表达谱数据。在R软件中对所有数据进行清洗、整理后,分析*SNTB1*以及*miR-543*在肿瘤组织及正常组织中的差异表达情况。进一步使用R软件中的survival包对二者的表达及患者生存情况进行比例风险假设检验并拟合生存回归,绘制Kaplan-Meier生存曲线。肿瘤组织及正常组织中SNTB1的蛋白表达数据由人类蛋白质图谱(Human Protein Atlas,HPA)数据库获取。

1.3 *SNTB1*与结直肠癌免疫微环境关系的评估

通过R软件提取TCGA数据库中CRC项目下*SNTB1*的表达谱数据以及113种免疫检查点基因的表达谱数据,并对其进行相关性分析,其中免疫检查点基因是通过检索Pubmed数据库并对相关文献进行整理后收集所得[8-10]。采用ESTIMATE算法对CRC微环境基质评分、免疫评分和ESTIMATE总评分进行计算,并据此评估*SNTB1*的表达与CRC免疫微环境评分的关系。进一步采用Cibersort算法和ssGSEA算法评估结直肠癌微环境中免疫细胞的浸润情况,并分析*SNTB1*的表达与免疫细胞浸润之间的关系。

1.4 细胞培养及转染

人正常肠上皮细胞NCM460和CRC细胞系(HT-29、SW480、LoVo)购自武汉尚恩生物技术有限公司。所有细胞常规培养于含10%胎牛血清和1%青-链霉素双抗的DMEM细胞液,置于37 ℃、5%CO_2中。

细胞转染依据试剂盒说明书进行操作。转染前将细胞接种至无血清培养液横纵同步化12 h后,用Lipofectamine™3000转染试剂将相应质粒转入HT-29细胞中,48 h后,收集细胞测定转染效率并用于后续实验。

检测miR-543和*SNTB1*的靶向调控关系,分组如下:空白对照(Ctrl)组、转染阴性对照miR(miR-NC)组和转染miR-543 mimics(miR-543 mimics)组。

检测HT-29细胞中miR-543/SNTB1轴对共培养体系$CD8^+$ T细胞的影响,分组如下:转染阴性对照siRNA(si-NC)组、转染SNTB1小分子干扰RNA(si-SNTB1)组、转染阴性对照miR和*SNTB1*表达的对照质粒(miR-NC+Ne)组、转染miR-543 mimics和SNTB1表达的对照质粒(miR-543+Ne)组、转染miR-543 mimics和SNTB1表达质粒(miR-543+SNTB1)组。

1.5 RT-qPCR实验

用TRIzol试剂提取各组总RNA,并进行逆转录以获得cDNA,利用SYBR Premix ExTaq™Ⅱ试剂盒进行实时定量PCR检测,反应程序设定:95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s,循环40次。检测结果以U6或β-actin为内参,采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法对各组*miR-543*或*SNTB1*的相对表达进行半定量分析。引物序列如表1所示。

1.6 Western blot检测

依据文献[11]进行操作。用RIPA裂解提取细胞总蛋白并进行Western blot电泳和电转操作。含有蛋白条带的PVDF膜经5%脱脂奶粉室温封闭30 min后,加入一抗[SNTB1(1∶2 000)和β-actin(1∶10 000)]4 ℃孵育过夜。漂洗后,室温孵育HRP标记二抗(1∶10 000)90 min。用ECL化学发光试剂显像蛋白条带,用Image J软件以β-actin为内参对SNTB1的表达进行半定量分析。

表1 RT-qPCR引物序列

基因	引物序列(5′→3′)
SNTB1	上游:CTGGAAGTGAAGTACATGCGAG
	下游:GGGATGCTTTTCCGGTCTCTG
β-actin	上游:GTTGTCGACGACGAGCG
	下游:GCACAGAGCCTCGCCTT
miR-543	上游:GGAAACATTCGCGGTGC
	下游:GTGCGTGTCGTGGAGTCG
U6	上游:GGAACGATACAGAGAAGATTAGC
	下游:TGGAACGCTTCACGAATTTGCG

1.7 $CD8^+$ T细胞分离、激活和共培养

$CD8^+$ T细胞由人外周血单个核细胞中分选得到,人外周血单个核细胞购自上海联组生物科技有限公司(LZ-YX9435)。具体操作如下:将人外周血单核细胞消化后转移至新的离心管中,根据操作说明采用EasySep人$CD8^+$ T细胞正选试剂盒分选出$CD8^+$ T细胞,再经Dynabeads人T活化剂CD3/CD28处理24 h,测定纯度后用于后续实验操作。共培养体系的构建:依据实验设计预先对HT-29细胞进行相关转染操作,各转染组HT-29细胞与经过CD3/CD28激活的$CD8^+$ T细胞按10∶1的效靶比进行共培养,48 h后收集细胞或上清液进行后续检测。

1.8 流式细胞术

通过流式细胞术对T细胞表面激活标志物CD69和CD25进行分析,具体操作如下:收集$CD8^+$ T细胞并添加FACS缓冲液予以重悬,采用anti-CD69(1∶200)和anti-CD25(1∶200)流式抗体在冰盒中避光孵育30 min,洗涤重悬细胞,经流式细胞仪检测、采集数据,采用FlowJo 10.8.2软件解析$CD8^+$ T细胞膜表面CD69和CD25的表达情况,据此评估$CD8^+$ T细胞的活化。

1.9 ELISA分析

收集各组共培养体系中的上清液,依据ELISA试剂盒的操作手册检测其中TNF-α、INF-γ和IL-2含量,并据此评估$CD8^+$ T细胞的效应功能。

1.10 LDH释放实验

采用LDH释放实验评估$CD8^+$ T细胞(效应细胞)对HT-29细胞(靶细胞)的细胞毒性作用。具体操作如下:各样品处理组均依据方法1.4中实验分组进行相应处理,同时另设:空白对照组(只含细胞培养液)、样品对照

组(只含HT-29细胞)、样品最大酶活性对照组(只含用于后续裂解的HT-29细胞),做好相应的标记。按照说明书,各孔分别取100 μL上清液并转移至新96孔板中,再加入10 μL LDH检测工作液避光孵育20 min,测定光密度[D(490)]值。依据以下公式计算细胞毒性:细胞毒性=($D_{样品处理组}-D_{样品对照组}$)/($D_{样品最大酶活性对照组}-D_{样品对照组}$)×100%。

1.11　*SNTB1*靶点预测与验证

结合starBase v2.0和TargetScan Human 8.0预测*SNTB1*的上游靶miRNA,并依据二者在3′UTR区域的互补结合序列设计野生型(SNTB1-WT)和突变型(SNTB1-MUT)荧光素酶报告基因质粒。将其分别与miR-NC或miR-543共同转染至HT-29细胞中,参照荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书要求对各组细胞裂解物荧光素酶的活性进行检测以评估miR-543与SNTB1的靶向关系。

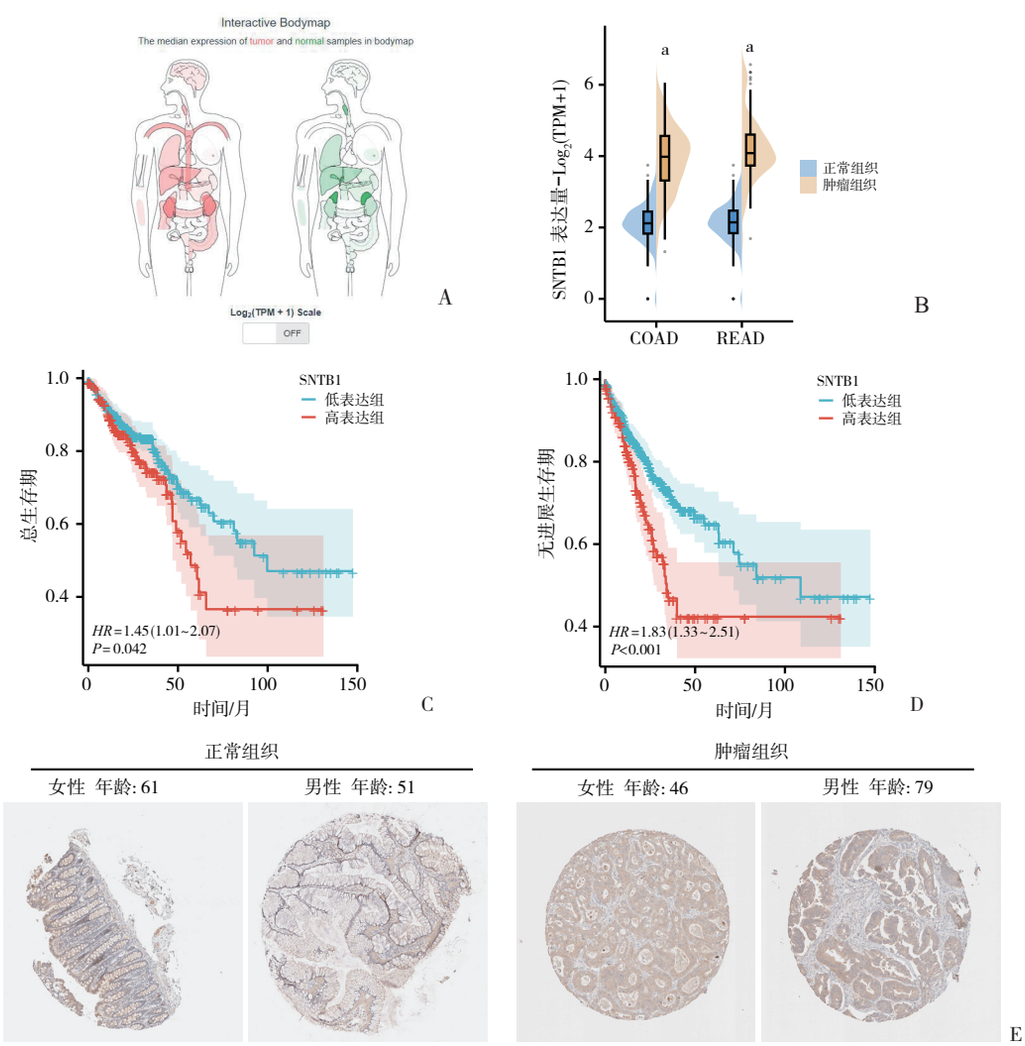
1.12　统计学分析

线上数据库数据采用R4.3.3软件和相应的网站进行分析及可视化;细胞实验数据采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析及可视化。符合正态分布的计量资料表示为$\bar{x}\pm s$,多组间比较采用one-way ANOVA分析,两组间比较采用独立样本t检验;不符合正态分布的计量资料表示为$M(P_{25},P_{75})$,组间比较采用χ^2检验。以P<0.05认为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　CRC中*SNTB1*的表达升高且与患者不良预后相关

GEPIA数据库获取人体各组织器官中*SNTB1*表达的交互式图谱如图1A所示:可见*SNTB1*在脑、肾、结直肠及子宫等多种肿瘤组织中的表达显著高于正



A:GEPIA数据库获取癌症组织及相应正常组织中*SNTB1*的表达;B:SNTB1在肿瘤组织(数据来自TCGA)和正常组织(数据来自GETx和TCGA)中的表达　a:P<0.001,与正常组织比较;C、D:Kaplan-Meier生存分析比较*SNTB1*高、低表达组的总生存期、无进展生存期;E:HPA数据库CRC和正常组织*SNTB1*蛋白表达的代表性免疫组化染色图

图1　SNTB1在CRC组织中的表达及其预后价值

常组织,提示SNTB1在某些肿瘤中可能发挥促癌作用。联合TCGA和GTEx数据,进一步分析*SNTB1*在结肠癌(colon adenocarcinoma, COAD)和直肠腺癌(rectum adenocarcinoma, READ)中的转录表达情况,结果显示,相较于正常组织,COAD和READ肿瘤组织中SNTB1的表达均显著升高(P<0.001,图1B)。用HPA数据库中的*SNTB1*免疫组化结果进行分析比对,相较于正常组织,肿瘤组织中的SNTB1蛋白表达水平明显升高(图1E)。以上结果提示:在CRC中,*SNTB1*呈显著高表达,为其作为CRC的潜在治疗靶点提供了强有力的证据。

收集合并TCGA数据库CRC患者(COAD和READ)的临床资料和生存数据并进行分析,结果显示相较于*SNTB1*高表达组,*SNTB1*低表达组患者具有更长的总生存期(P=0.042,图1C)和无进展生存期(P<0.001,图1D)。同时纳入患者TNM分期数据及*SNTB1*的表达数据进行预后单因素回归分析,结果显示*SNTB1*的表达可作为预测患者不良预后的独立指标(表2)。

表2 单因素Cox回归分析评估SNTB1的表达对结直肠癌患者无进展生存期的影响

变量	例数	*HR*(95%*CI*)	*P*
T分期			
T1+T2	131	1.000	
T3	435	2.742(1.545~14.864)	<0.001
T4	74	7.590(3.987~14.447)	<0.001
未知	3		
N分期			
N0	367	1.000	
N1	153	1.667(1.123~2.473)	0.011
N2	119	4.322(3.030~6.164)	<0.001
未知	4		
M分期			
M0	474	1.000	
M1	89	5.577(3.945~7.884)	<0.001
未知	80		
SNTB1 mRNA表达	643	1.325(1.120~1.566)	<0.001

2.2 *SNTB1*高表达的CRC患者肿瘤微环境的免疫活性较低

*SNTB1*与免疫检查点基因表达之间的相关性分析表明,*SNTB1*的表达与CD24、CD47、转化生长因子β受体1(transforming growth factor beta receptor 1, TGFBR1)、癌胚抗原相关的细胞黏附分子(carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1, CEACAM1)等免疫抑制因子具有一定的相关性(图2A),提示SNTB1可能影响CRC免疫微环境的构建。

通过ESTIMATE算法评估*SNTB1*的表达与CRC免疫微环境的关系,结果显示:*SNTB1*的表达与免疫评分(r=−0.25, P<0.001)以及ESTIMATE评分(r=−0.14, P<0.001)均呈一定的负相关关系(图2B~D)。

进一步采用Cibersort和ssGSEA算法对SNTB1的表达与常见免疫细胞的浸润进行相关性验证分析。Cibersort算法的结果显示:SNTB1表达与浆细胞(r=−0.09, P=0.03)、调节性T细胞(r=−0.21, P<0.001)、$CD8^+$ T细胞(r=−0.18, P<0.001)等免疫细胞浸润呈现一定的负相关(图2E)。ssGSEA算法的结果显示:*SNTB1*表达与19种免疫细胞浸润呈现一定的负相关(图2F),其中主要包括B细胞(r=−0.17, P<0.001)、DC细胞(r=−0.18, P<0.001)、中性粒细胞(r=−0.09, P=0.027)、$CD8^+$ T细胞(r=−0.08, P=0.04)。从以上两种算法的评估结果可以看出*SNTB1*表达与$CD8^+$ T细胞在结直肠癌组织中的浸润富集得分呈负相关。

以上结果提示,*SNTB1*的高表达预示着CRC患者肿瘤微环境具有较低的免疫活性,且可能参与抑制$CD8^+$ T细胞的功能。

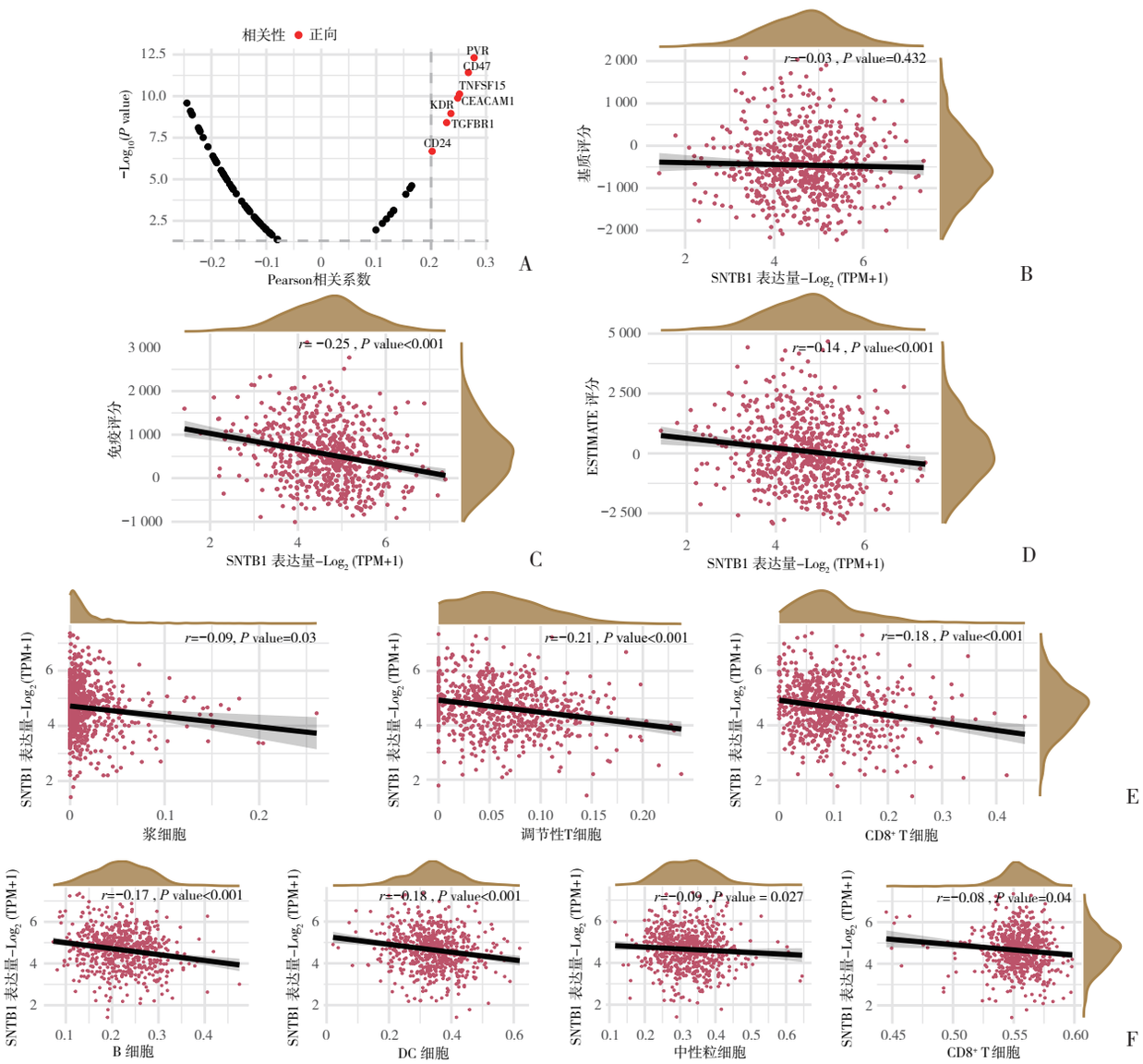
2.3 miR-543靶向调控SNTB1

为进一步探讨*SNTB1*在CRC中的调控网络,本研究通过StarBase在线数据库探索了可能影响SNTB1表达的上游*miRNA*,并对其在CRC中的表达进行相关性分析,结果表明*miR-543*与*SNTB1*的表达呈负相关(r=−0.130, P=0.005,图3A、B),且*miR-543*在结直肠癌中的表达显著降低(P<0.001,图3C)。此外,Kaplan-Meier生存分析的结果显示:在CRC中,miR-543低表达患者的总生存期和无进展生存期表现较差(P=0.006,图3D、E)。

通过体外细胞实验对3株常用CRC细胞系HT-29、SW480、LoVo中*SNTB1*和*miR-543*的表达进行验证,结果显示:相较于*NCM460*,*miR-543*在3株CRC细胞中均呈现一定程度的低表达(P<0.001),而*SNTB1*则表现出不同程度的高表达(P<0.001,图4A、B)。TargetScan数据库结果显示miR-543与SNTB1 3′UTR区存在7-mer结合位点(图4C),且双荧光素酶活性实验显示HT-29细胞中miR-543 mimics显著抑制野生型(WT组)报告载体的荧光素酶活性,证实miR-543是通过靶向SNTB1发挥调控作用(图4D)。此外,RT-qPCR和Western blot实验证实,在HT-29细胞中转染miR-543 mimics可抑制SNTB1的表达(P<0.001,图4E、F)。

2.4 HT-29细胞中miR-543靶向SNTB1促进$CD8^+$ T细胞活化并增强其细胞毒性

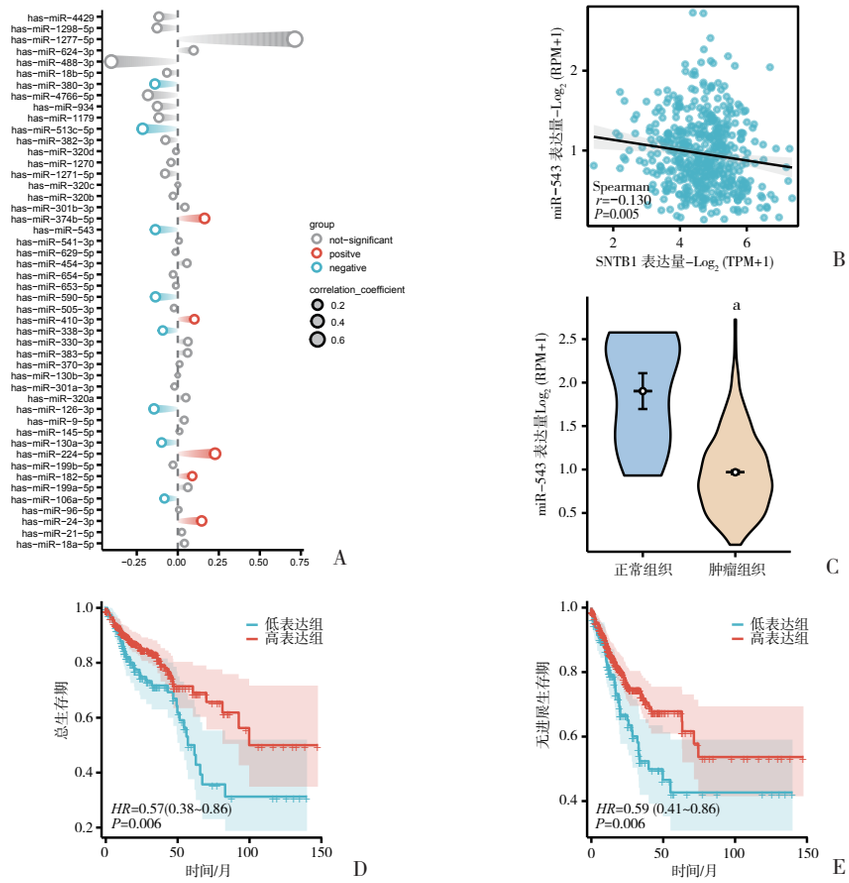
结合前期对肿瘤免疫微环境及免疫细胞浸润的分析,本研究进一步通过体外细胞共培养实验验证miR-543/SNTB1轴对CRC免疫微环境$CD8^+$ T细胞的作用。结果显示:转染si-SNTB1可显著抑制HT-29细胞



A:*SNTB1*与免疫检查点基因表达的相关性分析;B~D:ESTIMATE 算法分析*SNTB1*的表达与 CRC 患者免疫微环境评分的相关性;E:Cibersort 算法评估*SNTB1*的表达与 CRC 患者免疫细胞浸润的相关性;F:ssGSEA 算法评估 SNTB1 的表达与 CRC 患者免疫细胞浸润的相关性

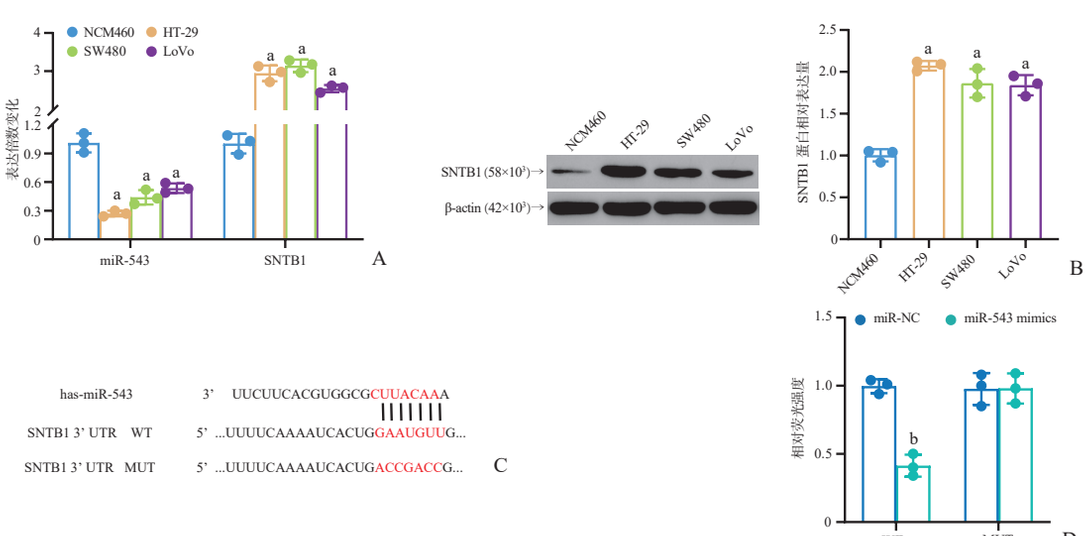
图 2 *SNTB1*表达与 CRC 免疫微环境的关系

中*SNTB1*的表达(P<0.01,图 5A、B),且转染 si-SNTB1 的 HT-29 细胞与 $CD8^+$ T 细胞共培养可促进 $CD8^+$T 细胞表面*CD69*和*CD25*的表达(P<0.01,图 5C、D),上调上清液中 TNF-α(P<0.001,图 5E)、INF-γ(P<0.001,图 5F)和 IL-2(P<0.01,图 5G)等细胞因子的水平,同时提升 $CD8^+$T 细胞对 HT-29 细胞的体外杀伤效应(P<0.001,图 5H)。结果证实敲减 SNTB1 可促进 $CD8^+$ T 细胞的活化并增强其体外杀伤作用。此外,相较于 miR-NC+Ne 组,转染 miR-543 mimics 的 HT-29 细胞(即 miR-543+Ne 组)与 $CD8^+$ T 细胞构建的共培养体系中的 $CD8^+$ T 细胞表面 CD69 和 CD25 的表达明显升高(P<0.05,图 5C、D);ELISA 结果显示,miR-543 mimics 组构建的共培养体系上清液中 TNF-α、INF-γ 和 IL-2 的水平均明显升高(P<0.05,图 5E~G),且 $CD8^+$ T 细胞对 HT-29 细胞的体外杀伤效应显著提升(P<0.001,图 5H)。然而,相较于 miR-543 mimics+Ne 组,共转染 SNTB1 表达质粒可逆转 miR-543 mimics 对共培养体系中 $CD8^+$ T 细胞的影响(P<0.05,图 5C~G)。以上结果说明,SNTB1 是 miR-543 的靶点,CRC 细胞过表达 miR-543 可通过靶向 SNTB1 促进 $CD8^+$ T 细胞活化并增强其对 CRC 细胞的杀伤作用(图 6)。



A:基于StarBase预测可影响*SNTB1*表达的上游*miRNA*及其与SNTB1表达的相关性;B:CRC中*miR-543*与*SNTB1*表达的相关性分析;C:基于TCGA数据库分析CRC中miR-543的表达　a:*P*<0.001,与正常组织比较;D、E:Kaplan-Meier生存分析比较miR-543高、低表达组的总生存期、无进展生存期

图3　CRC中miR-543的表达及预后价值

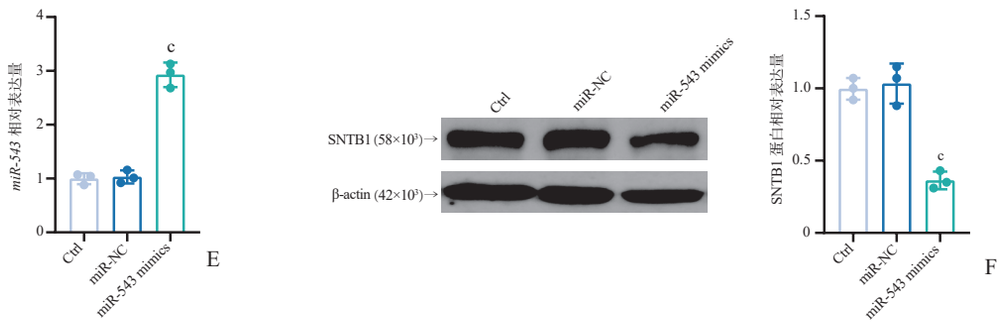


a:*P*<0.001,与NCM460组比较;b:*P*<0.01,c:*P*<0.001,与miR-NC组比较

A、B:RT-qPCR和Western blot检测正常肠上皮细胞NCM460和CRC细胞系细胞中miR-543和SNTB1的表达;C:基于TargetScan软件预测miR-543与SNTB1在3′ UTR区的结合位点;D:双荧光素酶报告基因法验证miR-543与SNTB1的靶向关系

图4　miR-543与SNTB1的靶向调控关系(n=3,$\bar{x}\pm s$)

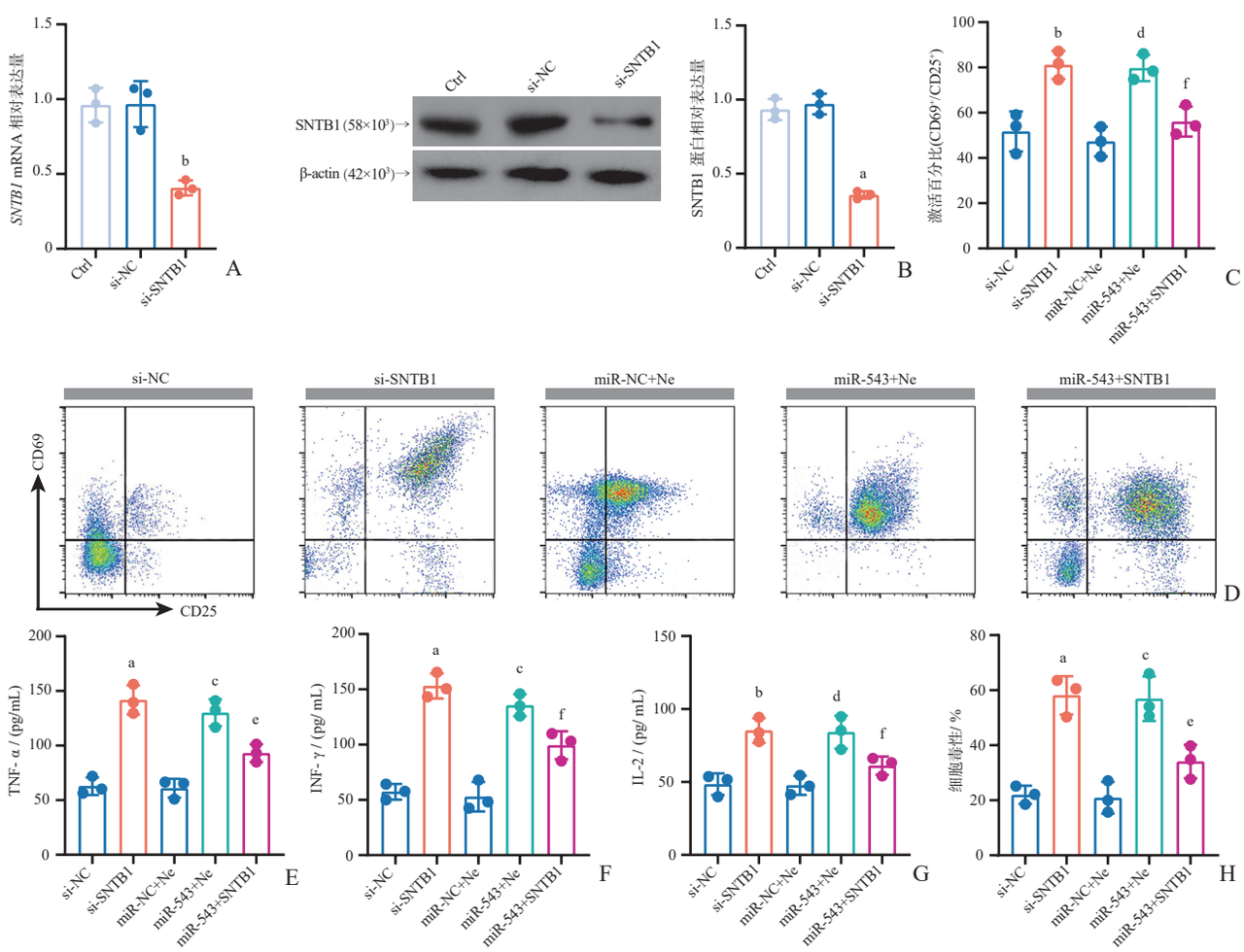
(图4E、F续下页)



a:P<0.001,与NCM460组比较;b:P<0.01,c:P<0.001,与miR-NC组比较

E:RT-qPCR检测*miR-543 mimics*在HT-29细胞中的相对表达量;F:Western blot检测转染miR-543 mimics后HT-29细胞中SNTB1蛋白相对表达量

续图4　miR-543与SNTB1的靶向调控关系(n=3,$\bar{x}\pm s$)



a:P<0.001,b:P<0.01,与si-NC组比较;c:P<0.001,d:P<0.01,与miR-NC+Ne组比较;e:P<0.01,f:P<0.05,与miR-543+Ne组比较

A、B:RT-qPCR和Western blot检测SNTB1相对表达量;C、D:流式细胞术分析各组细胞共培养体系中$CD8^+$ T细胞表面CD69和CD25的表达;E~G:ELISA法分析各组细胞共培养体系上清中TNF-α、IFN-γ和IL-2的分泌水平;H:LDH释放实验评估各组细胞共培养体系中$CD8^+$ T细胞的毒性作用

图5　HT-29细胞中miR-543/SNTB1轴对共培养体系$CD8^+$ T细胞的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

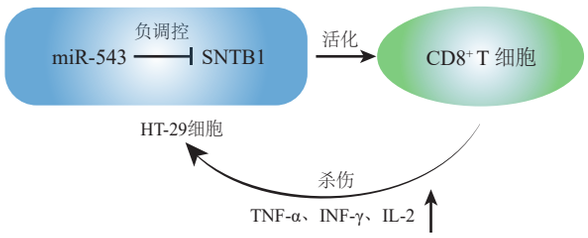


图6 免疫微环境作用机制图

3 讨论

3.1 *SNTB1*在CRC中可发挥促癌作用并参与调控肿瘤免疫微环境

现有研究表明*SNTB1*在CRC中表达上调,且可能发挥促癌作用[5-7];然而其在CRC中的具体作用以及其对CRC免疫微环境的影响尚不清晰。本研究对TCGA、GTEx以及HPA等数据库的大量数据进行综合分析,证实了*SNTB1*在CRC中呈高表达,且高表达*SNTB1*的患者具有较差的预后总生存期和无进展生存期;同时纳入患者TNM分期数据及*SNTB1*的表达数据进行预后单因素回归分析,显示*SNTB1*的表达可作为预测患者不良预后的独立指标。这一结果与前期的研究具有一致性[5-6],也为SNTB1成为CRC预后生物标志物的潜力提供了一定的理论基础。

Syntrophin家族调节癌症进展的各个步骤,如肿瘤生长、转移、治疗抵抗、免疫逃逸和肿瘤干性[5-7,12-13]。如在肺癌中,SNTG2与免疫细胞浸润和免疫检查点抑制具有相关性[12]。敲低*SNTB1*可通过调控β-catenin信号抑制CRC肿瘤干性和进展[13]。本研究据此对CRC中*SNTB1*与肿瘤微环境和肿瘤免疫之间的关系进行探索,结果发现结直肠癌中SNTB1的表达与某些免疫抑制因子具有相关性,且与患者免疫微环境评分和免疫细胞浸润,特别是$CD8^+$ T细胞的免疫浸润呈负相关。$CD8^+$ T细胞属于关键的细胞毒性T细胞,在肿瘤免疫应答过程中,能够识别表达特定抗原的肿瘤细胞,激活后可分泌多种细胞因子,例如TNF-α、INF-γ和IL-2等来增强免疫反应,并诱导肿瘤细胞的凋亡[14-17]。本研究通过体外细胞实验证实,在HT-29细胞中,敲低*SNTB1*可促进$CD8^+$ T细胞的活化,促进TNF-α、INF-γ和IL-2等细胞因子的释放,并增强其对HT-29的体外杀伤作用。以上结果提示在CRC中,*SNTB1*参与免疫微环境的构建,且可通过抑制$CD8^+$ T细胞在免疫逃逸中发挥作用;这可能是其发挥促癌作用的其中一个原因。

3.2 miR-543可调控SNTB1在CRC中发挥作用

此外,本研究进一步对*SNTB1*的上游调控靶点进行了探索和分析,结合数据库预测和实验验证证实*miR-543*是*SNTB1*的上游调控microRNA。研究表明,*miR-543*在CRC组织中高表达[18];且在非小细胞肺癌中,MEG3/miR-543/IDO信号轴与肿瘤细胞自噬和免疫反应密切相关[19]。本研究的结果显示,在CRC细胞HT-29中,miR-543可靶向抑制SNTB1的表达;同时miR-543mimics可促进共培养体系中$CD8^+$ T细胞的活化并增强其体外杀伤效应,而过表达SNTB1则可逆转miR-543 mimic对$CD8^+$ T细胞体外杀伤能力的促进效应。这为进一步理解SNTB1在CRC进展中的作用机制,特别是其在肿瘤免疫反应中的作用提供了新的视角,也为开发针对SNTB1的免疫治疗策略提供了理论基础。后续可通过临床样本的收集与验证为SNTB1临床应用价值提供更为丰富和稳健的实验依据。

综上所述,在CRC中SNTB1的表达上调,且高表达*SNTB1*的患者预后总生存期和无进展生存期均较短,同时*SNTB1*的高表达与CRC微环境较低的免疫活性相关,提示*SNTB1*可能成为评估CRC进展与预后的潜在生物标志物。此外,miR-543是SNTB1的上游调控miRNA,miR-543/SNTB1轴可影响结直肠癌微环境中$CD8^+$ T细胞的活化和体外杀伤作用。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] HAN B F, ZHENG R S, ZENG H M, *et al*. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53. DOI: 10.1016/j.jncc.2024.01.006.

[2] XIAO Y, YU D H. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer[J]. Pharmacol Ther, 2021, 221: 107753. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107753.

[3] ZHONG X Y, HE X F, WANG Y X, *et al*. Warburg effect in colorectal cancer: the emerging roles in tumor microenvironment and therapeutic implications[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 160. DOI: 10.1186/s13045-022-01358-5.

[4] BHAT S S, ALI R, KHANDAY F A. Syntrophins entangled in cytoskeletal meshwork: helping to hold it all together[J]. Cell Prolif, 2019, 52(2): e12562. DOI: 10.1111/cpr.12562.

[5] LIU L, CHEN Y, LIN X, *et al*. Upregulation of SNTB1 correlates with poor prognosis and promotes cell growth by negative regulating PKN2 in colorectal cancer[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 547. DOI: 10.1186/s12935-021-02246-7.

[6] CHANG Z Y, HUANG R Z, SONG J Q, *et al*. Modulation of SRC by SNTB1 activates the Hippo-YAP pathway during colon adenocarcinoma metastasis[J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 1029. DOI: 10.1186/s12967-024-05548-2.

[7] ZHANG H, LI Z, JIANG J, *et al*. SNTB1 regulates colorectal cancer cell proliferation and metastasis through YAP1 and the WNT/β-catenin pathway[J]. Cell Cycle, 2023, 22(17): 1865-1883. DOI: 10.1080/15384101.2023.2244778.

[8] ZENG D, YE Z, SHEN R, *et al*. IOBR: multi-omics immuno-oncology biological research to decode tumor microenvironment and signatures[J]. Front Immunol, 2021, 12: 687975. DOI: 10.3389/fimmu.2021.687975.

[9] HU F F, LIU C J, LIU L L, *et al*. Expression profile of immune checkpoint genes and their roles in predicting immunotherapy response[J]. Brief Bioinform, 2021, 22(3): bbaa176. DOI: 10.1093/bib/bbaa176.

[10] CHEN D, CAO H, ZHENG X, *et al*. Immune checkpoint gene signature assesses immune infiltration profiles in bladder cancer and identifies KRT23 as an immunotherapeutic target[J]. BMC Cancer, 2024, 24(1): 1024. DOI: 10.1186/s12885-024-12790-w.

[11] 张敏, 郜庆祖, 苏蔚. miR-29c-3p靶向ETV4增强结直肠癌顺铂耐药细胞株HT29/DDP对顺铂的敏感性[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2022, 31(5): 447-453. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2022.05.003.
ZHANG M, GAO Q Z, SU W. miR-29c-3p enhances the sensitivity of cisplatin-resistant colorectal cancer cell line HT29/DDP to cisplatin by targeting ETV4[J]. Chin J Histochem Cytochem, 2022, 31(5): 447-453. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2022.05.003.

[12] ZHOU J, WEN Y, CHEN X, *et al*. Bioinformatic analysis of prognostic value of SNTG2 with immune implications in lung adenocarcinoma[J]. Int J Gen Med, 2022, 15: 5181-5196. DOI: 10.2147/ijgm.s355393.

[13] LIANG Y, WANG B, CHEN S, *et al*. Beta-1 syntrophin (SNTB1) regulates colorectal cancer progression and stemness *via* regulation of the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(12): 1016. DOI: 10.21037/atm-21-2700.

[14] ZHOU X Y, CHEN Z Q, YU Y J, *et al*. Increases in 4-acetaminobutyric acid generated by phosphomevalonate kinase suppress $CD8^+$ T cell activation and allow tumor immune escape[J]. Adv Sci, 2024, 11(43): 2403629. DOI: 10.1002/advs.202403629.

[15] ZENG S S, HU H L, LI Z Y, *et al*. Local TSH/TSHR signaling promotes $CD8^+$ T cell exhaustion and immune evasion in colorectal carcinoma[J]. Cancer Commun, 2024, 44(11): 1287-1310. DOI: 10.1002/cac2.12605.

[16] RONG D W, SUN G S, ZHENG Z Y, *et al*. MGP promotes $CD8^+$ T cell exhaustion by activating the NF-κB pathway leading to liver metastasis of colorectal cancer[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(6): 2345-2361. DOI: 10.7150/ijbs.70137.

[17] 余忍忍, 吕浩, 储涵, 等. PRKCH的表达对$CD8^+$T细胞功能及黑色素瘤免疫治疗的影响[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(6): 556-566. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202310088.
YU R R, LYU H, CHU H, *et al*. Effects of PRKCH on $CD8^+$T cell function and melanoma immunotherapy[J]. J Army Med Univ, 2024, 46(6): 556-566. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202310088.

[18] DENG Y Y, MIN Y J, ZHOU K, *et al*. Identification of the tumor-suppressive role of circular RNA-FOXO3 in colorectal cancer *via* regulation of miR-543/LATS1 axis[J]. Oncol Rep, 2021, 46(5): 239. DOI: 10.3892/or.2021.8190.

[19] WANG C Q, TAO X B, WEI J G. Effects of LncRNA MEG3 on immunity and autophagy of non-small cell lung carcinoma through IDO signaling pathway[J]. World J Surg Oncol, 2021, 19(1): 244. DOI: 10.1186/s12957-021-02346-8.

(**收稿**:2025-04-18;**修回**:2025-06-20)

(编辑 刘秋池)