

# miR-325-3p和FOXP3在结直肠癌组织中的表达及临床意义

王春阳<sup>1</sup>, 马虎林<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>内蒙古科技大学包头医学院研究生院, 内蒙古 包头

<sup>2</sup>内蒙古自治区人民医院腹部肿瘤外科, 内蒙古 呼和浩特

收稿日期: 2026年4月14日; 录用日期: 2026年5月8日; 发布日期: 2026年5月18日

## 摘要

目的: 探讨微小RNA-325-3p (miR-325-3p)与叉头框蛋白P3 (FOXP3)在结直肠癌(CRC)组织中的表达情况, 分析两者表达与临床病理特征的关系, 探索两者在CRC发生和发展中的临床意义及潜在内在联系。方法: 采用实时荧光定量逆转录PCR (qRT-PCR)技术检测30例CRC患者癌组织与配对癌旁组织中miR-325-3p和FOXP3的表达水平; 将HCT116结直肠癌细胞分别转染miR-325-3p mimics (过表达组)和miR-325-3p inhibitor (抑制组), 通过CCK-8实验、Transwell实验检测miR-325-3p对CRC细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响; 利用生物信息学软件预测miR-325-3p与FOXP3的靶向关系, 结合双荧光素酶报告基因检测实验验证两者靶向关联; 采用SPSS20.0软件分析miR-325-3p、FOXP3表达与CRC患者临床病理特征的相关性, 通过Spearman相关性分析法分析两者表达水平的相关性。结果: ① miR-325-3p在CRC癌组织中的相对表达量( $0.630 \pm 0.119$ )显著低于癌旁组织( $1.109 \pm 0.206$ ) ( $P < 0.05$ ), 其表达与患者淋巴结转移、分化程度及TNM分期呈负相关( $P < 0.05$ ), 与性别、年龄、肿瘤大小无显著相关性( $P > 0.05$ ); ② FOXP3在CRC癌组织中的相对表达量( $4.893 \pm 1.753$ )显著高于癌旁组织( $1.168 \pm 0.371$ ) ( $P < 0.01$ ), 其表达与患者TNM分期、分化程度、肿瘤大小及淋巴结转移呈正相关( $P < 0.05$ ), 与性别、年龄无显著相关性( $P > 0.05$ ); ③ CCK-8实验显示, 过表达miR-325-3p可显著抑制CRC细胞增殖, 抑制miR-325-3p表达可促进CRC细胞增殖; Transwell实验显示, 过表达miR-325-3p可显著抑制CRC细胞侵袭、迁移能力, 抑制miR-325-3p表达可促进CRC细胞侵袭、迁移; ④ 生物信息学预测及双荧光素酶报告基因检测证实, miR-325-3p可直接靶向结合FOXP3的3'UTR特定位点; ⑤ Spearman相关性分析显示, CRC组织中miR-325-3p与FOXP3表达水平呈显著负相关( $P < 0.01$ )。结论: CRC组织中miR-325-3p低表达、FOXP3高表达, 两者呈显著负相关, 且均与CRC患者临床病理特征密切相关; miR-325-3p可能通过直接靶向负向调控FOXP3表达, 参与CRC的发生、侵袭及迁移过程, 可为CRC的靶向治疗及疾病监测提供新的分子靶点和研究思路。

## 关键词

结直肠癌, miR-325-3p, FOXP3, 细胞增殖, 侵袭迁移, 靶向调控

\*通讯作者。

# Expression and Clinical Significance of miR-325-3p and FOXP3 in Colorectal Cancer Tissues

Chunyang Wang<sup>1</sup>, Hulin Ma<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou Inner Mongolia

<sup>2</sup>Department of Abdominal Oncology Surgery, People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot Inner Mongolia

Received: April 14, 2026; accepted: May 8, 2026; published: May 18, 2026

## Abstract

**Objective:** To investigate the expression of microRNA-325-3p (miR-325-3p) and forkhead box protein P3 (FOXP3) in colorectal cancer (CRC) tissues, analyze the relationship between their expression and clinicopathological features, and explore their clinical significance and potential internal relationship in the occurrence and development of CRC. **Methods:** The expression levels of miR-325-3p and FOXP3 in cancer tissues and paired adjacent tissues of 30 patients with CRC were detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). HCT116 colorectal cancer cells were transfected with miR-325-3p mimics (overexpression group) and miR-325-3p inhibitor (inhibition group), respectively. The effects of miR-325-3p on the proliferation, invasion and migration of CRC cells were detected by CCK-8 assay and Transwell assay. The targeting relationship between miR-325-3p and FOXP3 was predicted by bioinformatics software, and the targeting relationship between miR-325-3p and FOXP3 was verified by dual luciferase reporter gene assay. SPSS20.0 software was used to analyze the correlation between the expression of miR-325-3p and FOXP3 and the clinicopathological features of CRC patients. Spearman correlation analysis was used to analyze the correlation between the expression levels of the two. **Results:** ① The relative expression of miR-325-3p in CRC tissues ( $0.630 \pm 0.119$ ) was significantly lower than that in adjacent tissues ( $1.109 \pm 0.206$ ) ( $P < 0.05$ ). The expression of miR-325-3p was negatively correlated with lymph node metastasis, differentiation degree and TNM stage ( $P < 0.05$ ), but not with gender, age and tumor size ( $P > 0.05$ ). ② The relative expression of FOXP3 in CRC tissues ( $4.893 \pm 1.753$ ) was significantly higher than that in adjacent tissues ( $1.168 \pm 0.371$ ) ( $P < 0.01$ ). The expression of FOXP3 was positively correlated with TNM stage, differentiation degree, tumor size and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ), but not with gender and age ( $P > 0.05$ ). ③ CCK-8 assay showed that overexpression of miR-325-3p could significantly inhibit the proliferation of CRC cells, and inhibition of miR-325-3p expression could promote the proliferation of CRC cells. Transwell experiments showed that overexpression of miR-325-3p could significantly inhibit the invasion and migration of CRC cells, and inhibition of miR-325-3p expression could promote the invasion and migration of CRC cells. ④ Bioinformatics prediction and dual luciferase reporter gene detection confirmed that miR-325-3p could directly target the specific site of FOXP3 3'UTR. ⑤ Spearman correlation analysis showed that there was a significant negative correlation between miR-325-3p and FOXP3 expression in CRC tissues ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The low expression of miR-325-3p and the high expression of FOXP3 in CRC tissues are significantly negatively correlated, and both are closely related to the clinicopathological features of CRC patients; miR-325-3p may be involved in the occurrence, invasion and migration of CRC by directly targeting and negatively regulating FOXP3 expression, which can provide new molecular targets and research ideas for targeted

## therapy and disease monitoring of CRC.

### Keywords

Colorectal Cancer, MiR-325-3p, FOXP3, Cell Proliferation, Invasion and Migration, Targeted Regulation

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

结直肠癌(CRC)是世界范围内高发的恶性消化道肿瘤[1]。受人口老龄化、生活方式和饮食习惯变化的影响, CRC的发病率呈持续上升趋势, 预计到2035年CRC死亡人数将翻一番[2]。中国是CRC发病率较高的国家之一, 其发病和死亡的比率均处于较高水平[3], 且多数患者确诊时已发生远处转移, 错过最佳手术治疗时机[4]。尽管化疗、放疗、免疫治疗及靶向治疗取得了一定进展, 但耐药性及低反应率仍是临床诊疗中亟待解决的难题[5]。因此, 探索CRC发生发展的分子机制, 挖掘新的诊断及治疗靶点, 对改善患者预后、降低死亡率具有重要意义。

微小RNA (microRNA, miRNA)是一类长度约22个核苷酸的内源性非编码小RNA, 通过靶向结合mRNA的3'UTR区域在转录后水平调控基因表达, 广泛参与肿瘤的发生、发展及转移过程[6]。miR-325-3p作为miRNA家族的重要成员, 已被证实于肝癌、肺癌、胶质瘤等多种肿瘤中低表达, 通过靶向调控相关基因抑制肿瘤细胞增殖、侵袭并诱导凋亡[7]-[9], 但在CRC中的表达模式及调控机制尚未完全明确。叉头框蛋白P3 (Forkhead Box Protein P3, FOXP3)是叉头框转录因子家族核心成员, 作为调节性T细胞(Tregs)的特异性标志物, 可通过调控免疫耐受及肿瘤细胞自身功能参与肿瘤进展, 其不同肿瘤中的表达及作用具有差异性[10]-[12]。

本研究通过检测miR-325-3p与FOXP3在CRC组织及癌旁组织中的表达, 分析两者与临床病理特征的相关性, 验证两者的靶向调控关系, 并探讨miR-325-3p对CRC细胞功能的影响, 为CRC靶向治疗及疾病监测相关靶点的研究提供了新思路。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 临床组织标本收集

收集手术切除且经病理证实的CRC组织及配对癌旁组织(距离肿瘤边缘 $\geq 5$  cm, 经病理确认无肿瘤细胞浸润)30例, 离体组织立即分割为指甲盖大小, 迅速冷冻于液氮中保存。记录患者性别、年龄、肿瘤大小、分化程度、TNM分期、淋巴结转移等临床病理资料。

纳入标准: ①术前未接受任何抗肿瘤治疗(化疗、放疗、靶向治疗等); ②临床病历资料完整; ③经病理学明确诊断为CRC, 癌旁组织无肿瘤细胞浸润; ④无其他严重系统性疾病及其他器官恶性肿瘤。排除标准: ①临床病历资料不全; ②癌症复发二次手术患者; ③术前接受过抗肿瘤治疗; ④合并其他器官恶性肿瘤或转移癌。

### 2.2. 细胞、主要试剂和仪器

细胞系、菌株及质粒: 所需HCT116细胞系, psiCHECK2双荧光素酶报告质粒, 野生型FOXP3荧

光素酶报告质粒(FOXP3-WT)和突变型荧光素酶报告质粒(FOXP3-MUT), inhibitor NC、miR-325-3p inhibitor、NC mimics、miR-325-3p mimics 均由擎科生物科技有限公司构建并提供。

主要试剂: 经典 miRNA 提取分离试剂盒(ONOBATE 公司, BL5701)、快捷型动物组织 RNA 提取试剂盒(ONOBATE 公司, BL21)、miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (BIOGENE 公司)、High performance qRT Master Mix (华罕公司, HBY201)、2\*Universal SYBR qPCR Master Mix (华罕公司, HQ101B)、CCK-8 试剂盒(碧云天公司, C0037)、双萤光素酶检测试剂盒(Promega 公司, E1910)等。

主要仪器: 倒置荧光显微镜(尼康, DS-Fi3)、荧光定量 PCR 仪(Roche, 480II Real Time PCR)、CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo Fisher, 3111)、台式高速冷冻离心机(Thermo Fisher Scientific, Fresco21)、萤光素酶检测仪(BLT, Lux-T020)等。

## 2.3. 实验方法

### 2.3.1. qRT-PCR 检测 miR-325-3p 和 FOXP3 的表达

按照试剂盒说明书, 分别提取 CRC 组织、癌旁组织及细胞中的 miRNA 和 mRNA, 使用紫外可见光分光光度计检测 RNA 纯度及浓度(A260/A280 比值在 1.8~2.0 视为合格)。采用 Stem-loop RT 法将 miRNA 反转录为 cDNA, 采用常规反转录法将 mRNA 反转录为 cDNA。以 U6 为 miR-325-3p 的内参基因,  $\beta$ -actin 为 FOXP3 的内参基因, 进行 qRT-PCR 检测。引物序列由上海生工生物工程技术有限公司合成, 具体序列见表 1。qRT-PCR 反应体系(20  $\mu$ l): 2\*Universal SYBR qPCR Master Mix 10  $\mu$ l, 上下游引物各 0.5~1  $\mu$ l, 模板 DNA 1~2  $\mu$ l, RNase-free ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ l。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30s, 循环反应 95 $^{\circ}$ C 10s、60 $^{\circ}$ C 60s (40 个循环), 降温 50 $^{\circ}$ C 30s。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因相对表达量。

**Table 1.** Primer sequences for target and reference genes

**表 1.** 目的基因及内参的引物序列

	Forward primer	Reverse primer
FOXP3	TCTGCACCTTCCCAAATCCC	TCATTGAGTGTCGCTGCTT
miR-325-3p	GGATGGTGGAAACGTACTTCTT	ATCTCCTGGTTTCCCTACAGTC
$\beta$ -actin	TCCCTGGAGAAGAGCTACGAGC	TGCCACAGGACTCCATGCCAG
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTG

### 2.3.2. 细胞转染及细胞功能实验

HCT116 细胞培养使用含 10%胎牛血清、1%双抗的 DMEM 的培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。将处于对数生长期的 HCT116 细胞分为 3 组: 空白对照组(不转染)、阴性对照组(转染 NC mimics/inhibitor)、实验组(转染 miR-325-3p mimics/inhibitor), 按照 Lipo2000 转染试剂说明书进行细胞转染, 转染后培养 48 h 用于后续实验。

CCK-8 实验检测细胞增殖能力: 转染 48 h 后, 将细胞接种于 96 孔板(每孔  $1 \times 10^4$  个细胞), 分别培养 0 h、24 h、48 h、72 h, 每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 试剂, 继续培养 2 h 后, 使用酶标仪检测 450 nm 波长下的吸光度(OD 值), 绘制细胞增殖曲线。

Transwell 实验检测细胞侵袭及迁移能力: 迁移实验: 将转染 48 h 后的细胞消化重悬, 调整浓度为  $1 \times 10^5$  个/ml, 取 200  $\mu$ l 细胞悬液加入 Transwell 小室上室, 下室加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基, 培养 24 h 后, 固定、染色, 显微镜下计数穿膜细胞数。侵袭实验: 提前将 Matrigel 基质胶铺于 Transwell 小室上室, 其余步骤同迁移实验。

### 2.3.3. 双荧光素酶报告基因检测

利用 Target Scan 软件初步预测 miR-325-3p 与 FOXP3 的靶向结合位点, 构建 FOXP3-WT (野生型) 和 FOXP3-MUT (突变型) 双荧光素酶报告质粒。将 HCT116 细胞接种于 24 孔板, 培养至细胞融合度达 70%~80% 时, 将 FOXP3-WT/FOXP3-MUT 质粒分别与 miR-325-3p mimics 或 NC mimics 共转染, 转染 48 h 后, 按照双荧光素酶检测试剂盒说明书检测萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性, 以海肾荧光素酶活性为内参, 计算相对荧光素酶活性。

### 2.3.4. 统计学方法

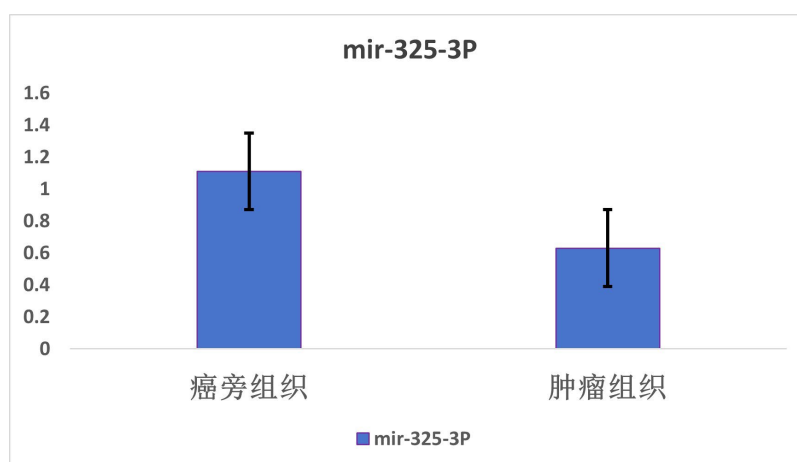
采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料以例数表示, 相关性分析采用 Spearman 秩相关分析。  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. miR-325-3p 在 CRC 组织中的表达及与临床病理特征的关系

qRT-PCR 检测结果显示, miR-325-3p 在 CRC 癌组织中的相对表达量为  $0.630 \pm 0.119$ , 显著低于癌旁组织的  $1.109 \pm 0.206$ , 差异具有统计学意义 ( $t = 11.264, P < 0.05$ )。见图 1。

相关性分析显示, miR-325-3p 的表达水平与 CRC 患者的淋巴结转移、分化程度及 TNM 分期密切相关 ( $P < 0.05$ ): 有淋巴结转移患者的 miR-325-3p 表达水平显著低于无淋巴结转移患者, 低分化患者显著低于中高分化患者, III + IV 期患者显著低于 I + II 期患者; miR-325-3p 表达与患者性别、年龄、肿瘤大小无显著相关性 ( $P > 0.05$ )。见表 2。



**Figure 1.** Relative expression of miR-325-3p in CRC and adjacent normal tissues  
**图 1.** miR-325-3p 在 CRC 组织及癌旁组织中的相对表达量

**Table 2.** Correlation between the expression level of miR-325-3p and the clinicopathological characteristics  
**表 2.** miR-325-3p 表达水平与 CRC 患者临床病理特征的相关性

特征	总计/n	miR-325-3p		$\chi^2$ 值	P 值
		低表达	高表达		
性别					
男	17	10	7	0.344	0.558
女	13	9	4		

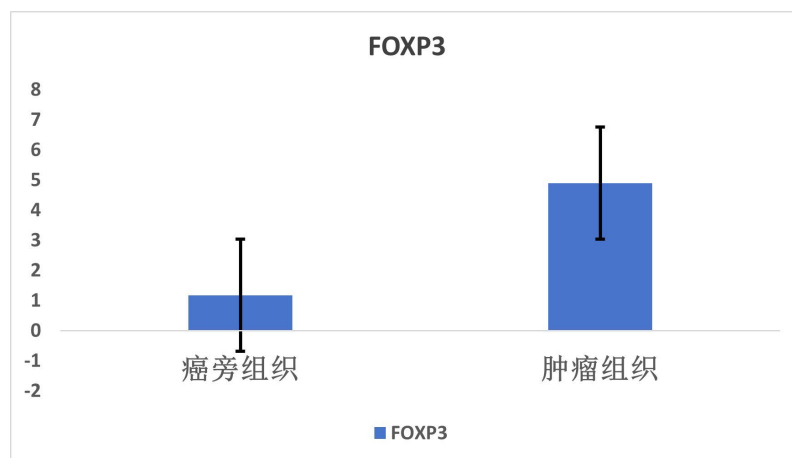
续表

年龄						
<60	7	4	3			
≥60	23	15	8	0.151		0.698
分化程度						
中高分化	16	13	3			
低分化	14	6	8	4.739		0.029
肿瘤大小/厘米						
<5	16	8	8			
≥5	14	11	3	2.625		0.105
淋巴结转移						
无	9	3	6			
有	21	16	5	4.983		0.026
TNM 分期						
I~II	13	5	8			
III~IV	17	14	3	6.111		0.023

### 3.2. FOXP3 在 CRC 组织中的表达及与临床病理特征的关系

qRT-PCR 检测结果显示, FOXP3 在 CRC 癌组织中的相对表达量为  $4.893 \pm 1.753$ , 显著高于癌旁组织的  $1.168 \pm 0.371$ , 差异具有统计学意义( $t = 2.764, P < 0.01$ )。见图 2。

相关性分析显示, FOXP3 的表达水平与 CRC 患者的 TNM 分期、分化程度、肿瘤大小及淋巴结转移密切相关( $P < 0.05$ ): III + IV 期患者的 FOXP3 表达水平显著高于 I + II 期患者, 低分化患者显著高于中高分化患者, 肿瘤大小  $\geq 5$  cm 患者显著高于  $< 5$  cm 患者, 有淋巴结转移患者显著高于无淋巴结转移患者; FOXP3 表达与患者性别、年龄无显著相关性( $P > 0.05$ )。见表 3。



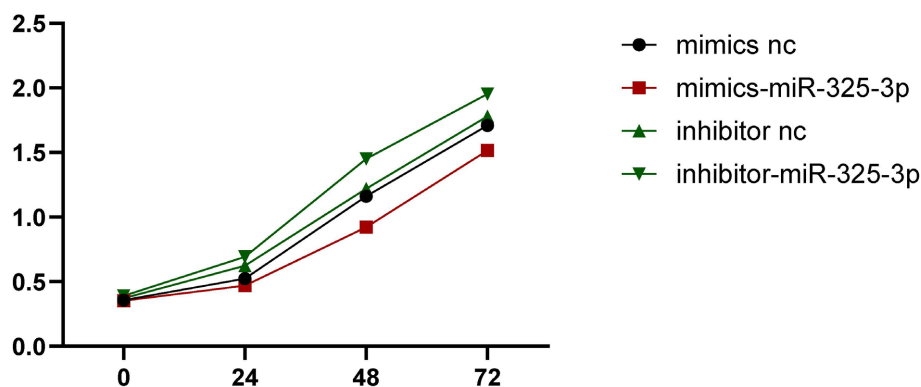
**Figure 2.** Relative expression of FOXP3 in CRC and adjacent non-tumor tissues  
**图 2.** FOXP3 在 CRC 组织及癌旁组织中的相对表达量

**Table 3.** Correlation between the expression level of FOXP3 and the clinicopathological characteristics  
**表 3.** FOXP3 表达水平与 CRC 患者的临床病理特征的相关性

特征	总计/n	FOXP3		$\chi^2$ 值	P 值
		高表达	低表达		
性别					
男	17	9	7	0.117	0.732
女	13	7	7		
年龄					
<60	7	4	3	0.053	0.818
≥60	23	15	8		
分化程度					
中高分化	16	12	4	6.467	0.011
低分化	14	4	10		
肿瘤大小/厘米					
<5	16	5	11	6.718	0.010
≥5	14	11	3		
淋巴结转移					
无	9	2	7	5.013	0.025
有	21	14	7		
TNM 分期					
I~II	13	3	10	8.438	<0.009
III~IV	17	13	4		

### 3.3. miR-325-3p 对 CRC 细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响

CCK-8 增殖实验结果显示, miR-325-3p mimics 和 inhibitor 及其对照序列转染结肠癌细胞后, 早期 (0 h 与 24 h) 各组细胞活力无显著差别 ( $P > 0.05$ )。然而在转染后 48 h, HCT116 细胞中, 上调 miR-325-3p 表达明显抑制细胞增殖 (与 NC mimics 组相比差异显著即  $P < 0.05$ ), 而下调 miR-325-3p 则显著促进细胞增殖 (较 inhibitor-NC 组  $P < 0.05$ ), 见图 3。



**Figure 3.** Proliferation curves of HCT116 cells in various groups

**图 3.** 不同组 HCT116 细胞增殖能力曲线

Transwell 实验结果显示, 与空白对照组和阴性对照组相比, miR-325-3p mimics 组穿膜细胞数显著减少( $P < 0.05$ ), 细胞侵袭、迁移能力显著降低; miR-325-3p inhibitor 组穿膜细胞数显著增多( $P < 0.05$ ), 细胞侵袭、迁移能力显著增强。见图 4、图 5。

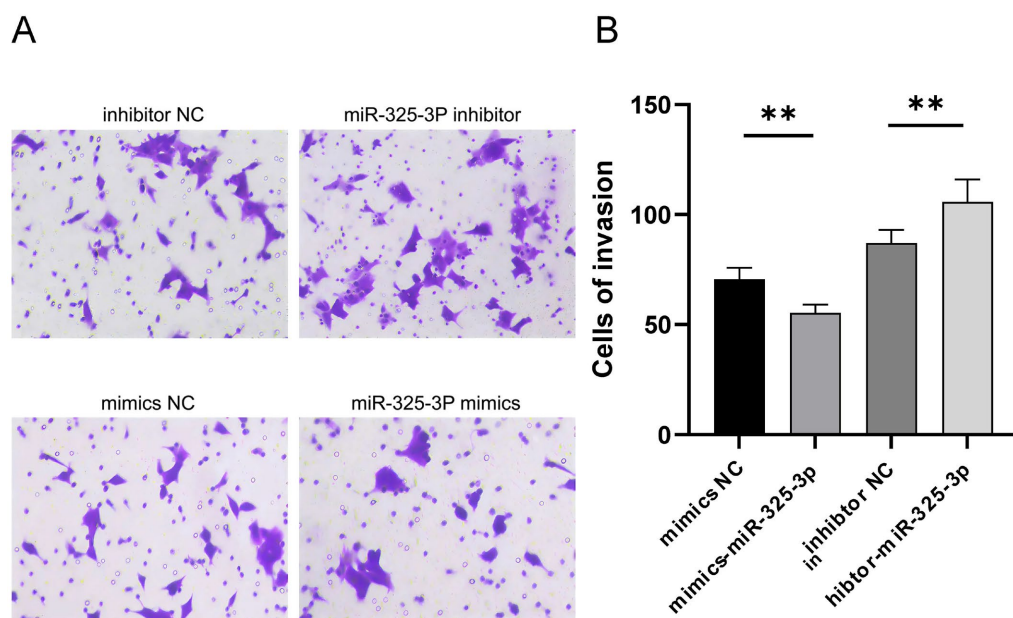


图 A 是 miR-325-3p 过表达和抑制 miR-325-3p 表达对 HCT116 细胞侵袭能力影响的 Transwell 结果的代表性图像, 图 B 是对图 A 的统计结果。

**Figure 4.** Effects of miR-325-3p expression on invasion of CRC cells

**图 4.** miR-325-3p 的不同表达对 CRC 细胞侵袭能力影响的结果

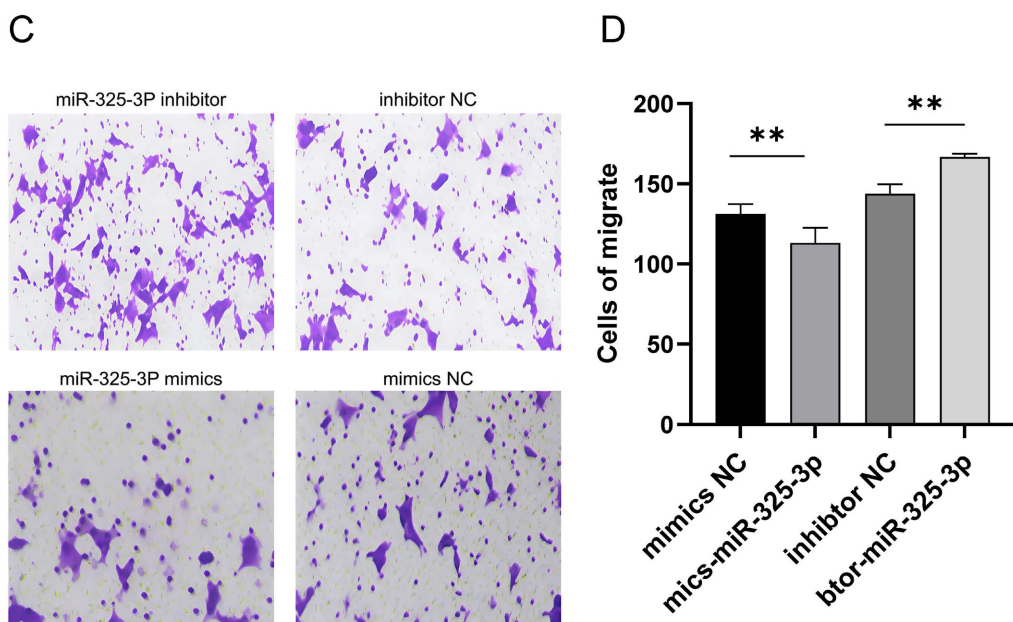


图 C 是 miR-325-3p 过表达和抑制 miR-325-3p 表达对 HCT116 细胞迁移能力影响的 Transwell 结果的代表性图像, 图 D 是对图 C 的统计结果。

**Figure 5.** Effects of miR-325-3p expression on migration of CRC cells

**图 5.** miR-325-3p 的不同表达对 CRC 细胞迁移能力影响的结果

### 3.4. miR-325-3p 与 FOXP3 的靶向关系验证

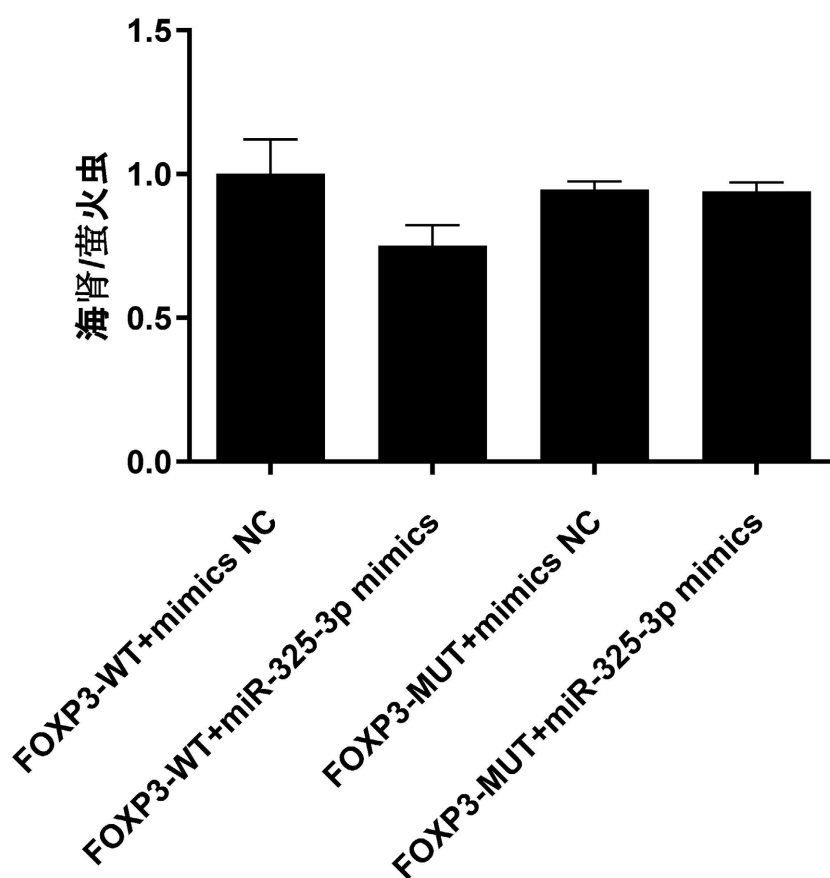
生物信息学软件 Target Scan 预测显示, miR-325-3p 与 FOXP3 的 3'UTR 区域可能存在特异性结合位点(见表 4)。双荧光素酶报告基因检测结果显示, 与 NC mimics 组相比, miR-325-3p mimics 组 FOXP3-WT 质粒的相对荧光素酶活性显著降低( $P < 0.05$ ), 而 FOXP3-MUT 质粒的相对荧光素酶活性无显著变化( $P > 0.05$ ), 证实 miR-325-3p 可直接靶向结合 FOXP3 的 3'UTR 特定位点。见图 6。

**Table 4.** miR-325-3p-FOXP3 binding site (predicted by TargetScan)

**表 4.** TargetScan 数据库预测 miR-325-3p 与 FOXP3 的结合位点

Locus Information	Predicted Base Pairing (Target 3'UTR top, miRNA bottom)	Site Type
Position 872-878 of FOXP3 3' UTR	5'...ccacaguaccgucCCAAUAAAc...3'	7mer-A1
hsa-miR-325-3p	3'...aacuauccuccaggaGUUAUUU...5'	

注: 序列中大写字母为两者结合位点 7mer-A1。



**Figure 6.** Luciferase reporter assay verifying the targeting of miR-325-3p to FOXP3

**图 6.** 荧光素酶报告基因实验验证 miR-325-3p 和 FOXP3 的靶向关系

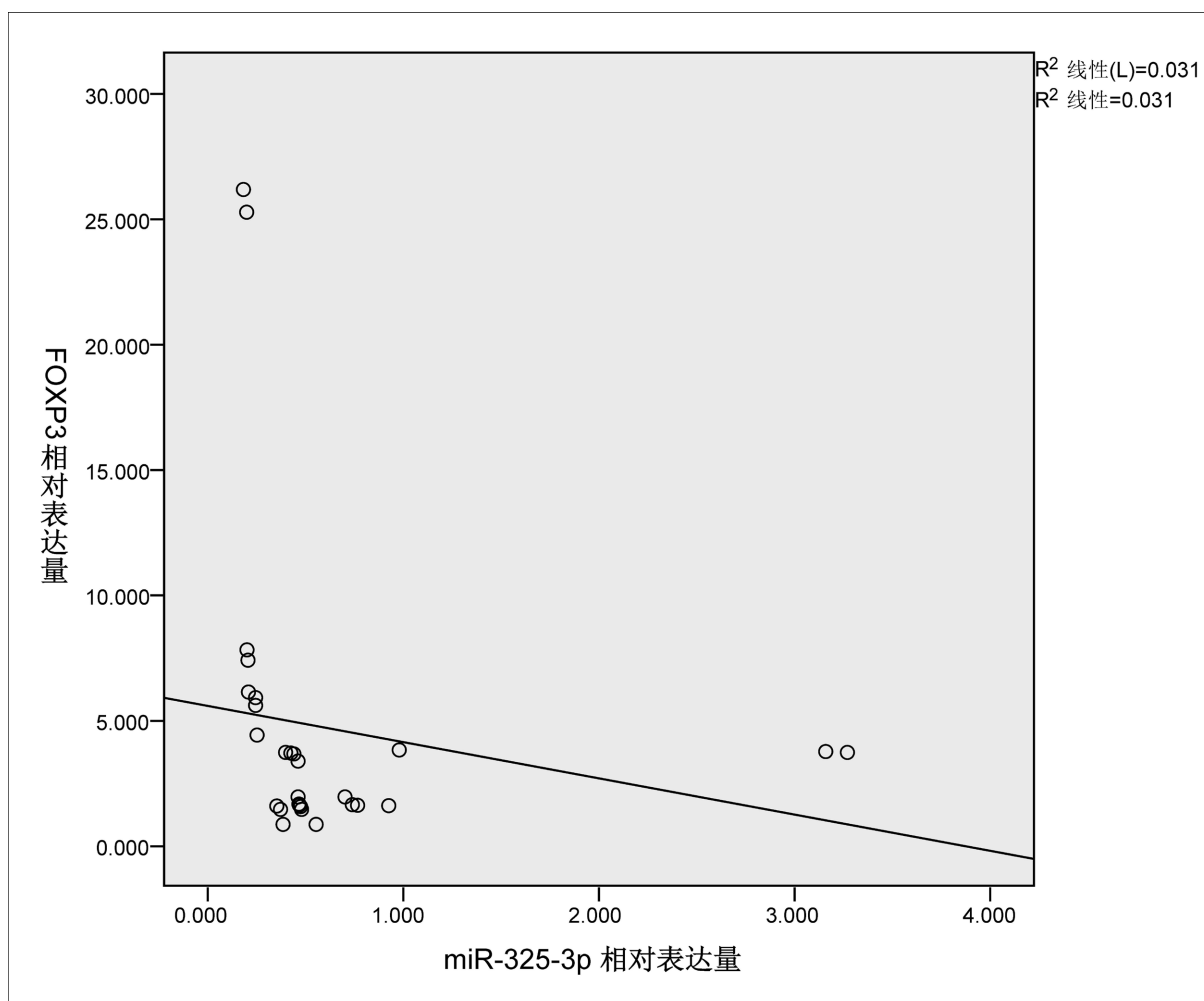
### 3.5. CRC 组织中 miR-325-3p 与 FOXP3 表达的相关性

Spearman 相关性分析显示, CRC 组织中 miR-325-3p 的相对表达量与 FOXP3 的相对表达量呈显著负相关( $P < 0.01$ ), 提示两者可能存在协同调控关系。见表 5 和图 7。

**Table 5.** Results of Spearman correlation analysis**表 5.** Spearman 相关性分析表

		miR-325-3p 相对表达量	FOXP3 相对表达量
miR-325-3p 相对表达量	相关系数	1.000	-0.511**
	Sig.(双侧)	.	0.004
	N	30	30
Spearman 的 rho	相关系数	-0.511**	1.000
	Sig.(双侧)	0.004	.
	N	30	30

注: \*\*在置信度(双侧)为 0.01 时, 相关性是显著的。

**Figure 7.** Scatter plot with linear regression of miR-325-3p and FOXP3 expression**图 7.** miR-325-3p 与 FOXP3 表达量的散点图及线性回归拟合图

#### 4. 讨论

CRC 的发生与发展已成为全球性的健康问题, 在所有类型的癌症中发病率和死亡率几乎最高[1]。手术切除联合化疗是早期 CRC 的主要治疗方法[4]。然而大多数患者就诊时肿瘤已发生转移, 导致治疗效

果不佳、预后较差[5]。因此,深入探索 CRC 发生发展的分子机制,挖掘关键调控分子及新型诊疗靶点,是改善患者预后、降低死亡率的关键。随着高通量测序、蛋白质组学等技术的广泛应用[13],多种信号通路、转录因子及非编码 RNA 被证实参与 CRC 发病[14],为 CRC 的预后监测和靶向治疗提供了新方向。

miRNA 作为内源性非编码小 RNA 分子,可通过调控相关靶基因广泛参与细胞增殖、迁移、发育、细胞周期调控及凋亡等生理病理过程[15][16]。在 CRC 中,已发现多种 miRNA 参与肿瘤的发生与发展。如 miR-495-3p 通过下调 HMGB1、miR-205-5p 通过调控 PTK7,分别抑制 CRC 细胞增殖迁移或参与其增殖凋亡过程[17][18]。miR-325-3p 在不同肿瘤中的表达及功能具有明显的组织特异性。在胶质瘤中低表达,通过靶向 FOXM1、SOX9 发挥抑癌作用,与患者不良预后相关[9];在乳腺癌中高表达,靶向 S100A2 促进肿瘤进展[19]。这种异质性与肿瘤组织微环境、靶基因表达差异相关。而其在 CRC 中仅被证实可靶向 S100A4 抑制骨转移[20],具体表达情况及靶基因调控网络仍不明确。

FOXP3 在不同肿瘤中的作用被广泛研究,FOXP3 是 Treg 细胞的关键转录因子,通过调控 Treg 细胞的发育、功能及免疫稳态,在调节免疫耐受和肿瘤相关生物学行为中发挥重要作用[10]-[12]。已有研究表明[21],CRC 肿瘤微环境中 FOXP3<sup>+</sup> Treg 浸润水平显著高于正常肠道组织,其分泌的 IL-10、TGF- $\beta$  等免疫抑制因子可抑制 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞活化,减少抗肿瘤细胞因子分泌,构建免疫耐受微环境,促进肿瘤侵袭转移。另有研究表明[22],FOXP3<sup>+</sup> Treg 可通过表达 CTLA-4、PD-1 等免疫检查点分子,与肿瘤细胞表面 PD-L1、B7 结合增强免疫抑制,且其浸润水平与患者生存期呈负相关,与本研究 FOXP3 高表达提示不良预后的结果一致。除免疫逃逸功能外,FOXP3 在 CRC 细胞内的固有促癌作用同样重要,且二者存在协同调控关系。Mortezaei 等人研究发现[23][24],FOXP3 存在于多种癌细胞株中,与 IL-10、TGF- $\beta$  高度相关,提示其可通过调控免疫因子间接参与免疫微环境调控。在肝癌细胞中,FOXP3 可定位于细胞核内,作为转录因子激活 STAT3 信号通路、上调 MMP-2、MMP-9 表达,从而促进细胞增殖、增强侵袭迁移能力[25],与本研究中 FOXP3 高表达与肿瘤大小、淋巴结转移、TNM 分期相关的结果相印证。更重要的是,CRC 细胞内 FOXP3 高表达与 FOXP3<sup>+</sup> Treg 浸润存在相互促进的协同效应[26][27]:CRC 细胞高表达 FOXP3 可分泌 CCL22、CXCL12 等趋化因子,募集 FOXP3<sup>+</sup> Treg 浸润;而 Treg 分泌的 TGF- $\beta$ 、IL-10 又可促进 CRC 细胞 FOXP3 表达,形成“FOXP3 高表达-免疫抑制-肿瘤进展”的恶性循环。已有研究证实,FOXP3 高表达与 CRC 不良预后相关,但其上游调控机制仍不明确,为本研究探索 miR-325-3p 对 FOXP3 的靶向调控提供了契机。

已有研究证实,miRNA 与 FOXP3 通过多条生物学通路调控肿瘤的发生与发展,miRNA 也可直接靶向 FOXP3 影响肿瘤生物学行为。促癌因子 circRUNX1 作为“分子海绵”吸附 miRNA,通过解除 miRNA 对其靶基因的抑制,进而调控肿瘤细胞的恶性生物学行为。在食管鳞癌及 CRC [28][29]中,通过解除 miR-449b-5p 对 FOXP3 的抑制作用,进而提升 FOXP3 的 mRNA 和蛋白水平从而使 FOXP3 发挥促癌作用。同样,miR-6132、miR-149-3p 也可通过调控 FOXP3 参与疾病进展[30][31]。因此推测 FOXP3 可能是 miR-325-3p 在 CRC 中的下游靶基因。本文以 miR-325-3p 与 FOXP3 的靶向调控关系为核心,深入探讨二者协同调控 CRC 发生发展的分子机制。

本研究通过 qRT-PCR 检测发现,miR-325-3p 在 CRC 中表达下调,与淋巴结转移、TNM 分期、分化程度显著相关,可作为潜在预后指标;细胞功能实验证实,过表达 miR-325-3p 可抑制 HCT116 细胞增殖、侵袭迁移,抑制其表达则作用相反,明确其抑癌作用。

miR-325-3p 的抑癌作用需通过靶向其下游靶基因实现。因此本研究利用生物信息学筛选及双荧光素酶实验验证表明,miR-325-3p 可直接靶向 FOXP3 的 3'UTR 特定位点。为进一步明确二者在 CRC 组织中的表达相关性,通过 qRT-PCR 技术检测显示,与癌旁组织相比,FOXP3 在 CRC 癌组织中表达量显著升高;卡方检验分析表明,FOXP3 表达与 CRC 患者的淋巴结转移、TNM 分期、分化程度、肿瘤大小均显

著相关, 进一步验证其在 CRC 中的促癌作用。Spearman 相关性分析结果证实, miR-325-3p 与 FOXP3 表达呈显著负相关, 结合靶向验证结果, 进一步明确了二者的调控关系。

综上所述, miR-325-3p 可通过直接靶向并负向调控 FOXP3 的表达进而影响 CRC 的增殖、侵袭、迁移及恶性进展。此外, 陈等人[32]研究发现, 口腔鳞状癌细胞(OSCC)中 miR-325-3p 可靶向负调控 FOXP3 并诱导 OSCC 免疫逃逸, 这一结果进一步证实了 miR-325-3p 靶向 FOXP3 的调控模式, 提示该调控机制可能具有肿瘤普遍性, 为本研究结论提供了相应的佐证支持。

本研究存在一定局限性: 样本量较小(30 例), 结果可能存在偏倚; 未进一步验证 miR-325-3p/FOXP3 轴调控 CRC 进展的具体下游信号通路; 细胞实验中细胞系选择单一。后续研究将扩大样本量及细胞系, 深入探索 miR-325-3p/FOXP3 轴的调控机制, 并通过体内实验进一步验证其在 CRC 中的作用, 为 CRC 的临床诊疗提供更可靠的理论依据。

## 5. 结论

CRC 组织中 miR-325-3p 低表达、FOXP3 高表达, 两者呈显著负相关; miR-325-3p 可通过直接靶向负向调控 FOXP3 表达, 抑制 CRC 细胞增殖、侵袭及迁移能力; miR-325-3p 和 FOXP3 均与 CRC 患者临床病理特征密切相关, 可能参与 CRC 的发生、发展及恶性进展, 可为 CRC 的靶向治疗及疾病监测提供新的分子靶点和研究思路。

## 伦理批准

本研究获得内蒙古自治区人民医院伦理委员会批准(审批号: SC-07/02KT2024154Y)。

## 基金项目

内蒙古卫生健康科技计划项目, 项目编号: 2025WSJK023, 项目名称: STAT 5/TET2 信号轴调控 DNA 主动去甲基化在结直肠癌发生发展中的作用及机制研究。

## 参考文献

- [1] Troeger, C., Blacker, B.F., Khalil, I.A., Rao, P.C., Cao, S., Zimsen, S.R., *et al.* (2018) Estimates of the Global, Regional, and National Morbidity, Mortality, and Aetiologies of Diarrhoea in 195 Countries: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*, **18**, 1211-1228. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30362-1)
- [2] 黄陈, 戎泽印. 结直肠癌诊治新进展[J]. 蚌埠医学院学报, 2018, 43(10): 1356-1360.
- [3] 李荔, 郑荣寿, 王少明, 等. 中国结直肠癌流行现状及 2000-2019 年趋势变化[J]. 中华肿瘤杂志, 2026, 48(1): 130-136.
- [4] 中国抗癌协会结直肠癌专业委员会. 中国结直肠癌诊疗指南(2023 版) [J]. 中华胃肠外科杂志, 2023, 26(4): 305-329.
- [5] Zhang, Y., Li, J. and Wang, H. (2022) Advances in Targeted Therapy for Colorectal Cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **41**, Article 289.
- [6] Song, C., Chen, W., Kuang, J., Yao, Y., Tang, S., Zhao, Z., *et al.* (2021) Recent Advances in the Detection of Multiple Micromas. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **139**, Article 116269. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116269>
- [7] Li, L., Ji, Y., Chen, Y. and Zhen, Z. (2021) MiR-325-3p Mediate the CXCL17/CXCR8 Axis to Regulate Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma. *Cytokine*, **141**, 155436. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155436>
- [8] Gan, H., Lin, L., Hu, N., Yang, Y., Gao, Y., Pei, Y., *et al.* (2019) KIF2C Exerts an Oncogenic Role in Nonsmall Cell Lung Cancer and Is Negatively Regulated by miR-325-3p. *Cell Biochemistry and Function*, **37**, 424-431. <https://doi.org/10.1002/cbf.3420>
- [9] Xiong, Q. and Su, H. (2021) MiR-325-3p Functions as a Suppressor Mirna and Inhibits the Proliferation and Metastasis of Glioma through Targeting FOXM1. *Journal of Integrative Neuroscience*, **20**, 1019-1028. <https://doi.org/10.31083/j.jin2004103>

- [10] Weinstein, K.N., Domeier, P.P. and Ziegler, S.F. (2024) A Splice of Life: The Discovery, Function, and Clinical Implications of Foxp3 Isoforms in Autoimmune Disease. *International Immunology*, **37**, 83-90. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxae049>
- [11] 任贺, 李鑫. 转录因子 FOXP3 在不同肿瘤中的表达及功能研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(10): 508-514.
- [12] Deng, G., Song, X., Fujimoto, S., Piccirillo, C.A., Nagai, Y. and Greene, M.I. (2019) Foxp3 Post-Translational Modifications and Treg Suppressive Activity. *Frontiers in Immunology*, **10**, Article 102486. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02486>
- [13] Menyhart, O. and Györfy, B. (2021) Multi-Omics Approaches in Cancer Research with Applications in Tumor Subtyping, Prognosis, and Diagnosis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **19**, 949-960. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.009>
- [14] Postwala, H., Shah, Y., Parekh, P.S. and Chorawala, M.R. (2023) Unveiling the Genetic and Epigenetic Landscape of Colorectal Cancer: New Insights into Pathogenic Pathways. *Medical Oncology*, **40**, 334-334. <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02201-8>
- [15] Jang, J.H. and Lee, T. (2021) The Role of MicroRNAs in Cell Death Pathways. *Yeungnam University Journal of Medicine*, **38**, 107-117. <https://doi.org/10.12701/yujm.2020.00836>
- [16] 汪艇. MiR-21-5p 靶向 SCML2 对肝癌细胞增殖和有氧糖酵解的调控作用[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽医科大学, 2023.
- [17] Xing, J., Chen, P.L. and Yu, J.W. (2024) Non-Small Cell Lung Cancer-Derived Exosomal Circular RNA circEZH2 Activates Fibroblasts by Regulating the miR-495-3p/TPD52 axis and NF- $\kappa$ B Pathway. *Chinese Journal of Oncology*, **46**, 1176-1186.
- [18] Zhu, F. and Ren, Z. (2022) Icarin Inhibits the Malignant Progression of Lung Cancer by Affecting the PI3K/Akt Pathway through the Mir-205-5p/PTEEN Axis. *Oncology Reports*, **47**, Article No. 115. <https://doi.org/10.3892/or.2022.8326>
- [19] Wang, H., Hu, X., Yang, F. and Xiao, H. (2021) MiR-325-3p Promotes the Proliferation, Invasion, and EMT of Breast Cancer Cells by Directly Targeting S100a2. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, **28**, 731-744. <https://doi.org/10.3727/096504020x16100888208039>
- [20] Li, C., Zhang, Y., Xie, X., et al. (2021) Mir-325-3p, a Novel Regulator of Osteoclastogenesis in Osteolysis of Colorectal Cancer through Targeting S100a4. *Molecular Medicine*, **27**, Article No. 23. <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00282-7>
- [21] Yaghoubi, N., Soltani, A., Ghazvini, K., Hassanian, S.M. and Hashemy, S.I. (2019) PD-1/ PD-L1 Blockade as a Novel Treatment for Colorectal Cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **110**, 312-318. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.105>
- [22] Rupp, T., Genest, L., Babin, D., Legrand, C., Hunault, M., Froget, G., et al. (2022) Anti-CTLA-4 and Anti-Pd-1 Immunotherapies Repress Tumor Progression in Preclinical Breast and Colon Model with Independent Regulatory T Cells Response. *Translational Oncology*, **20**, Article 101405. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101405>
- [23] Mortezaee, K. (2024) Foxp3 (in)Stability and Cancer Immunotherapy. *Cytokine*, **178**, Article 156589. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2024.156589>
- [24] Bending, D. and Ono, M. (2017) FoxP3 Partners Up. *Nature Immunology*, **18**, 1181-1183. <https://doi.org/10.1038/ni.3852>
- [25] Gulubova, M.V., Chonov, D.C., Ivanova, K.V., Hristova, M.K., Krasimirova-Ignatova, M.M. and Vlaykova, T.I. (2022) Intratumoural Expression of IL-6/STAT3, IL-17 and Foxp3 Immune Cells in the Immunosuppressive Tumour Microenvironment of Colorectal Cancer *Immune Cells-Positive for IL-6, STAT3, IL-17 and Foxp3 and Colorectal Cancer Development. Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **36**, 327-338. <https://doi.org/10.1080/13102818.2022.2072765>
- [26] Xu, P., Fan, W., Zhang, Z., Wang, J., Wang, P., Li, Y. and Yu, M. (2017) The Clinicopathological and Prognostic Implications of FoxP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Patients with Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Frontiers in Physiology*, **8**, Article ID: 950.
- [27] Idorn, M., Olsen, M., Halldórsdóttir, H.R., Skadborg, S.K., Pedersen, M., Høgdall, C., et al. (2017) Improved Migration of Tumor Ascites Lymphocytes to Ovarian Cancer Microenvironment by CXCR2 Transduction. *OncImmunology*, **7**, e1412029. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2017.1412029>
- [28] Wang, C., Zhou, M., Zhu, P., Ju, C., Sheng, J., Du, D., et al. (2022) IGF2BP2-Induced Circrunx1 Facilitates the Growth and Metastasis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma through miR-449b-5p/Foxp3 Axis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **41**, Article No. 347. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02550-8>
- [29] Lulli, M., Napoli, C., Landini, I., Mini, E. and Lapucci, A. (2022) Role of Non-Coding RNAs in Colorectal Cancer:

---

Focus on Long Non-Coding RNAs. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article 13431.

<https://doi.org/10.3390/ijms232113431>

- [30] Zhang, Y., Zhang, Z., Li, H., Chu, C., Liang, G., Fan, N., *et al.* (2024) Increased miR-6132 Promotes Deep Vein Thrombosis Formation by Downregulating Foxp3 Expression. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, **11**, Article ID: 1356286. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2024.1356286>
- [31] Xu, Q., Tang, J., Liao, H., Yu, B., He, X., Zheng, Y., *et al.* (2021) Long Non-Coding RNA MEG3 Mediates the miR-149-3p/Foxp3 Axis by Reducing P53 Ubiquitination to Exert a Suppressive Effect on Regulatory T Cell Differentiation and Immune Escape in Esophageal Cancer. *Journal of Translational Medicine*, **19**, Article No. 264. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02907-1>
- [32] Chen, Y., Li, Z., Liang, J., Liu, J., Hao, J., Wan, Q., *et al.* (2022) CircRNA Has\_Circ\_0069313 Induced OSCC Immunity Escape by miR-325-3p-Foxp3 Axes in Both OSCC Cells and Treg Cells. *Aging*, **14**, 4376-4389. <https://doi.org/10.18632/aging.204068>