

# miR-577 在胃癌中的表达及对 SGC-7901 细胞侵袭的影响

何银平 叶景旺

**摘要** **目的** 研究微小 RNA 577 (microRNA-577, miR-577) 在人胃癌 (gastric cancer, GC) 组织内的表达情况及对肿瘤细胞侵袭能力的影响。**方法** 选择 2013 年 1 月 ~ 2015 年 3 月于第三军医大学大坪医院普通外科收治并行手术切除的 70 例胃癌与对应癌旁组织。通过 qRT-PCR 方法检测 miR-577 在组织中的相对表达量, 分析 miR-577 的临床病理意义; 采用人工合成的 miR-577 模拟物 (miR-577 mimics) 转染人胃癌 SGC-7901 细胞, 并检测 SGC-7901 细胞过表达 miR-577 后侵袭能力及 miR-577 下游潜在靶点  $\beta$ -catenin mRNA 及蛋白的表达变化。**结果** miR-577 在胃癌组织中表达显著下调 ( $P=0.000$ ) 并与与淋巴结转移 ( $P=0.003$ )、高 TNM 分期 ( $P=0.006$ ) 等不良临床特征呈正相关; 过表达 miR-577 能够显著抑制 SGC-7901 细胞侵袭能力 ( $P=0.000$ ) 及细胞内  $\beta$ -catenin 的表达水平。**结论** miR-577 在胃癌中低表达, 并可能通过下调  $\beta$ -catenin 的表达来抑制胃癌细胞的侵袭。

**关键词** MicroRNA-577 胃癌  $\beta$ -catenin 侵袭

**中图分类号** R73-3

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.10.025

**Expression of miR-577 and Its Role for Cell Invasion in Human Gastric Carcinoma.** He Yinping, Ye Jingwang. Department of Information Section, Daping Hospital of The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

**Abstract** **Objective** To identify the level of microRNA-577 and its effect for cell invasion in human gastric carcinoma (GC). **Methods** The level of miR-577 in 70 paired GC and matched non-tumor tissues collecting between January 2011 and March 2015 was detected by qRT-PCR. We then transfected the miR-577 mimics into SGC-7901 cells. Cell invasion ability was measured by transwell assay. qRT-PCR and western-blot were used to detect the expression of  $\beta$ -catenin, a potential target of miR-577, in transfected SGC-7901 cells. **Results** miR-577 was low expression in gastric cancer tissues and correlated with lymphatic metastasis ( $P=0.003$ ) and advanced TNM stage ( $P=0.006$ ). Transfection of miR-577 mimics could suppress cell invasion ( $P=0.000$ ) and inhibit the expression of  $\beta$ -catenin ( $P=0.000$ ). **Conclusion** miR-577 was low expression in GC tissues, and miR-577 could suppress GC invasion through down-regulating  $\beta$ -catenin.

**Key words** microRNA-577; Gastric cancer;  $\beta$ -catenin; Invasion

胃癌 (gastric cancer, GC), 是上消化道常见恶性肿瘤之一, 消化性溃疡是胃癌发生的重要原因之一<sup>[1]</sup>。由于许多患者就诊时已无根治手术机会, 全身化疗反应率又低, 故 5 年生存率不足 20%<sup>[2]</sup>。

microRNA 是一种能够抑制靶点 mRNA 的表达并具有一定临床意义的短链核苷酸序列<sup>[3]</sup>。例如, 胃癌组织中 microRNA-21 呈现异常高表达, 并且高表达 miR-21 的患者大多预后较差, 分子生物学研究结果证实 miR-21 通过抑制抗增殖蛋白 PDCD4 的表达来发挥促胃癌生长效应<sup>[4,5]</sup>; microRNA-218 可以

通过下调 Hedgehog/smoothed 信号通路的活性而逆转胃癌细胞多重耐药 (multidrug resistance) 表型<sup>[6]</sup>。miR-577 对许多恶性肿瘤的发生、发展均具有调控作用<sup>[7]</sup>。本研究通过探索 miR-577 在胃癌组织及细胞中的表达及其对肿瘤侵袭表型的影响机制, 旨在为研究 microRNA 成为胃癌分子生物学诊治靶点提供部分研究基础。

## 材料与方法

1. 临床标本: 选取 2013 年 1 月 ~ 2015 年 3 月于第三军医大学大坪医院普通外科收治并行手术切除的 70 例胃癌与对应癌旁组织, 其中男性患者 50 例, 女性患者 20 例, 患者年龄 42 ~ 74 岁, 平均年龄  $54.7 \pm 1.4$  岁, 所有标本于离体半小时内取材储存于液氮或中性甲醛溶液中。Fast 1000 RNA 提取试剂盒

作者单位: 400042 重庆, 第三军医大学大坪医院信息资料科 (何银平), 野战外科研究所胃肠结直肠外科 (叶景旺)

通讯作者: 何银平, 电子信箱: HYP47hgf@163.com

购自上海飞捷生物科技有限公司, RT-PCR 试剂盒 [PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)] 及 real-time PCR 试剂盒 [SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)] 均购自宝生物工程(大连)有限公司。脂质体转染试剂 Lipofectamine® 2000 购自英伟杰公司。miR-577、 $\beta$ -catenin 及  $\beta$ -actin 商品化引物由北京澳科公司合成, miR-577 mimics 转染试剂盒购自上海吉玛生物科技有限公司。

2. qRT-PCR: 按 Fast 1000 试剂说明书方法提取组织或细胞中的 microRNA 及 mRNA, RT-PCR 反应合成 cDNA。实时 PCR 反应体系中加入 2  $\mu$ l cDNA 为模板, 并按说明书指定条件反应并计算基因相对表达量。

3. 细胞转染: SGC-7901 由笔者医院实验室保存, 胃癌细胞培养在 6 孔板中, miR-577 组(每孔): 100pmol miR-577 mimics & 5  $\mu$ l Lipo2000; 阴性对照(negative control, NC)组(每孔): 100pmol NC mimics & 5  $\mu$ l Lipo 2000。以无血清培养基培养 6~8h 后, 更换完全培养基继续培养。

4. Transwell 侵袭小室: SGC-7901 细胞在转染 48h 后消化、重悬并调整密度为  $1 \times 10^5$ /ml, 基质胶包被的 Transwell 小室上室中每孔接种 250  $\mu$ l, 下室每孔加入 750  $\mu$ l 完全培养基。培养 24h 后吸出上室内培养基并洗涤小室, 4% 多聚甲醛固定后使用结晶紫染色, 棉棒擦去上室面残余细胞, 在显微镜下计数下室面细胞数量。

5. Western blot 法检测: SGC-7901 细胞转染 72h 后使用 RIPA 法提取细胞总蛋白并定量, 以 50  $\mu$ g 蛋白/(样本·孔)加样, 垂直电泳分离目的蛋白。采用 BIO-RAD 湿转系统进行蛋白转印, 以 1:1000 的  $\beta$ -catenin 一抗及  $\beta$ -actin 一抗检测蛋白表达。

6. 统计学方法: 收集实验数据并录入进 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 连续性变量以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用 Student-t 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 胃癌组织中 miR-577 表达情况: 所收集的胃癌组织中 miR-577 表达量为  $2.13 \pm 0.14$ , 与之对应癌旁组织中 miR-577 表达量为  $6.26 \pm 0.20$ 。其中 59 例 GC 组织(84.29%)中 miR-577 的相对表达量低于对应癌旁组织, 二者差异有统计学意义( $t = 4.578, P = 0.000$ , 图 1)。

2. miR-577 低表达的临床意义: 按不同临床病

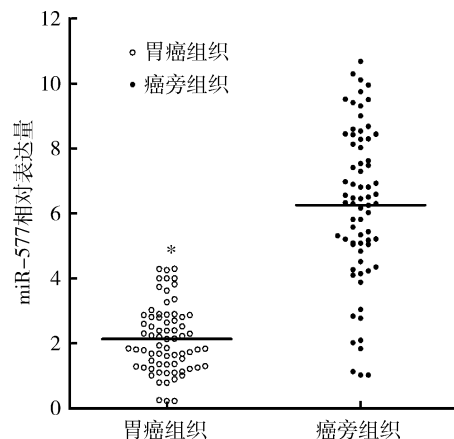


图 1 MiR-577 在胃癌中的表达

与癌旁组织比较, \*  $P = 0.000$

理特征将 70 例 GC 组织中 miR-577 表达量进行 Student-t 检验, 在具有肿瘤淋巴结转移和高 TNM 分期(Ⅲ+Ⅳ)两种病理特征的胃癌组织中 miR-577 的表达显著降低( $P < 0.05$ , 表 1)。

表 1 miR-577 表达与胃癌患者临床病理特征的关系 ( $n = 70$ )

| 临床病理特征    | miR-577 表达量     | P     |
|-----------|-----------------|-------|
| 年龄(岁)     |                 |       |
| > 50      | $2.61 \pm 0.10$ | 0.098 |
| $\leq 50$ | $2.28 \pm 0.13$ |       |
| 性别        |                 |       |
| 男性        | $2.43 \pm 0.19$ | 0.133 |
| 女性        | $2.23 \pm 0.11$ |       |
| Hp 感染     |                 |       |
| 阳性        | $2.63 \pm 0.13$ |       |
| 阴性        | $2.33 \pm 0.14$ |       |
| 肿瘤直径(cm)  |                 |       |
| < 3       | $2.53 \pm 0.11$ | 0.076 |
| $\geq 3$  | $2.29 \pm 0.17$ |       |
| 淋巴结转移     |                 |       |
| 无         | $4.79 \pm 0.14$ | 0.003 |
| 有         | $1.14 \pm 0.12$ |       |
| TNM 分期    |                 |       |
| I + II    | $3.55 \pm 0.11$ | 0.006 |
| Ⅲ + Ⅳ     | $1.05 \pm 0.14$ |       |

3. miR-577 mimics 转染人胃癌 SGC-7901 细胞: 为进一步研究 miR-577 对胃癌细胞生物学行为的影响, 笔者选取人胃癌 SGC-7901 为干预细胞, 过表达 miR-577 后通过 qRT-PCR 检测证实 miR-577 转染 SGC-7901 细胞后可显著升高细胞内 miR-577 的表达( $t = 15.131, P = 0.000$ , 图 2)。

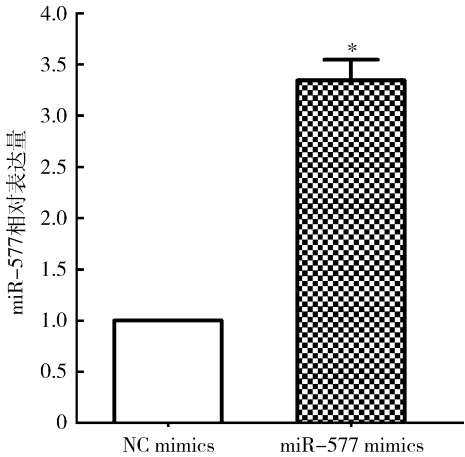


图2 miR-577 mimics 转染 SGC-7901 细胞与 NC mimics 比较, \* P = 0.000

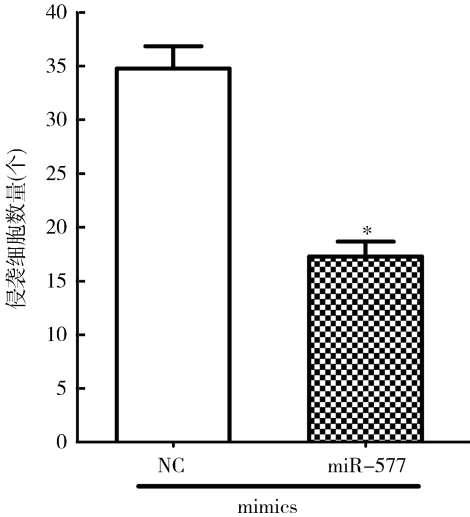
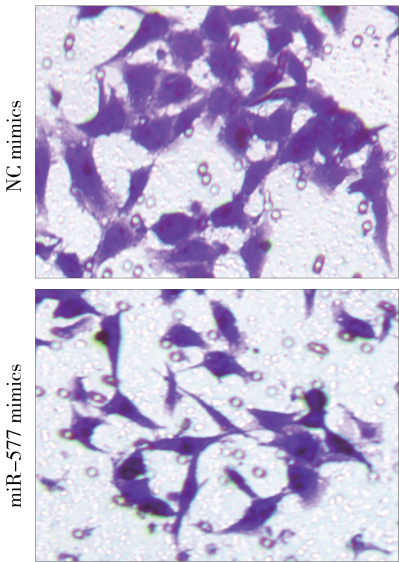


图3 miR-577 对 SGC-7901 细胞侵袭能力的影响与 NC 比较, \* P = 0.000

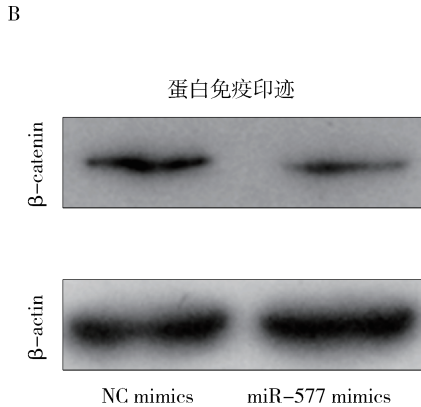
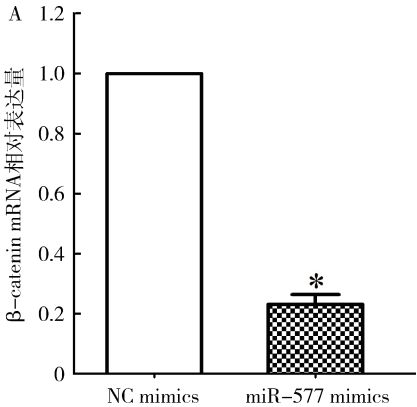


图3 过表达 miR-577 下调 SGC-7901 细胞中 β-catenin 的表达与 NC mimics 比较, \* P = 0.000

讨 论

恶性肿瘤之一,靶向药物赫赛汀的出现有效延长了晚期胃癌患者的生存期,也证明了分子靶向治疗在改善

胃癌患者预后中的重要作用<sup>[8]</sup>。

microRNA 的异常表达在胃癌进展过程中是一种常见现象。例如, miR - 128b 低表达与胃腺癌组织中, 体外促进 miR - 128b 的表达可通过抑制 PDK1/Akt/NF -  $\kappa$ B 的激活而显著抑制胃癌细胞的生长<sup>[9]</sup>。本研究通过 70 例的组织学样本检测首先证实了 miR - 577 广泛低表达于胃癌组织当中, 相关统计学分析表明, 低表达 miR - 577 的患者在诊断时多已有淋巴结转移的存在, 并且其病情分期 (TNM 分期) 亦较晚, 说明低 miR - 577 表达的胃癌患者多预后不良。MiR - 577 是一种多靶点的抑癌 microRNA。Zhang 等<sup>[10]</sup>已经发现, miR - 577 能够下调 Wnt 信号通路上的关键分子, 脂蛋白受体相关蛋白 6 (lipoprotein receptor related protein, LRP6) 的表达来抑制恶性脑胶质瘤的生长。Yuan 等<sup>[11]</sup>的研究成果也表明, miR - 577 通过下调 TSGA10 实现对食管鳞癌细胞的增殖抑制、凋亡诱导和细胞周期阻滞作用。在本研究中, 笔者应用化学合成的 miR - 577 模拟物在人胃癌 SGC - 7901 细胞中过表达 miR - 577, 通过 Transwel 试验证实 miR - 577 能够通过抑制 SGC - 7901 细胞侵袭。

$\beta$  - catenin 是 Wnt 信号通路上的关键分子之一,  $\beta$  - catenin 的核内转移并与 LEF/TCF 形成转录调节复合体是 Wnt 信号通路激活的标志<sup>[12]</sup>。这一复合体对包括 cyclinD1、c - myc、MMP7 在内的多个侵袭相关癌基因的转录都有正向调控作用<sup>[13]</sup>。因而,  $\beta$  - catenin 在肿瘤生物治疗中具有重要的研究价值。临床试验结果表明甲磺酸伊马替尼可干扰 Wnt/ $\beta$  - catenin 通路阻止白血病髓外转移, M475271、AZD0530、Bosutinib 等 Wnt/ $\beta$  - catenin 通路实验性靶向药物对抗前列腺癌、乳腺癌等肿瘤的转移也取得了一定效果<sup>[14-17]</sup>。 $\beta$  - catenin 为 miR - 577 的下游潜在生物靶点之一。为研究 miR - 577 在胃癌中  $\beta$  - catenin 的调控作用, 通过体外转染的方法在胃癌细胞内过表达 miR - 577, 经检测, 胃癌细胞内  $\beta$  - catenin 的表达水平受到显著抑制。多柔比星是胃癌全身化疗的关键药物之一, 研究证实, 胃癌细胞中  $\beta$  - catenin 的过度表达和核内转移是促进胃癌细胞上皮细胞间质化 (epithelial - mesenchymal transition, EMT) 转变和多柔比星治疗抵抗的重要原因之一<sup>[18]</sup>。因而, 本研究所证实的 miR - 577 对  $\beta$  - catenin 表达的负调控作用, 可能对改善患者的多柔比星耐药患者的治疗及预后具有重要临床应用价值。

#### 参考文献

1 Gao J, Xie L, Yang WS, *et al.* Risk factors of hepatocellular carcino-

ma - current status and perspectives [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13 (3): 743 - 752

2 Su CH, Lin Y, Cai L. Genetic factors, viral infection, other factors and liver cancer: an update on current progress [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14 (9): 4953 - 4960

3 Tu K, Zheng X, Dou C, *et al.* MicroRNA - 130b promotes cell aggressiveness by inhibiting peroxisome proliferator - activated receptor gamma in human hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15 (11): 20486 - 20499

4 Tu H, Sun H, Lin Y, *et al.* Oxidative stress upregulates PDCD4 expression in patients with gastric cancer via miR - 21 [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20 (11): 1917 - 1923

5 Eto K, Iwatsuki M, Watanabe M, *et al.* The microRNA - 21/PTEN pathway regulates the sensitivity of HER2 - positive gastric cancer cells to trastuzumab [J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21 (1): 343 - 450

6 Zhang XL, Shi HJ, Wang JP, *et al.* MiR - 218 inhibits multidrug resistance (MDR) of gastric cancer cells by targeting Hedgehog/smoothened [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8 (6): 6397 - 6406

7 Ji H, Chen M, Greening DW, *et al.* Deep sequencing of RNA from three different extracellular vesicle (EV) subtypes released from the human LIM1863 colon cancer cell line uncovers distinct miRNA - enrichment signatures [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (10): e110314

8 Yuan DD, Zhu ZX, Zhang X, *et al.* Targeted therapy for gastric cancer: current status and future directions (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35 (3): 1245 - 1254

9 Zhang L, Lei J, Fang ZL, *et al.* MiR - 128b is down - regulated in gastric cancer and negatively regulates tumour cell viability by targeting PDK1/Akt/NF -  $\kappa$ B axis [J]. *J Biosci*, 2016, 41 (1): 77 - 85

10 Zhang W, Shen C, Li C, *et al.* miR - 577 inhibits glioblastoma tumor growth via the Wnt signaling pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2015, 12: 3774 - 3788

11 Yuan X, He J, Sun F, *et al.* Effects and interactions of MiR - 577 and TSGA10 in regulating esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6 (12): 2651 - 2667

12 Wang W, Li X, Lee M, *et al.* FOXKs promote Wnt/ $\beta$  - catenin signaling by translocating DVL into the nucleus [J]. *Dev Cell*, 2015, 32 (6): 707 - 718

13 Singh Monga SP. Beta - catenin signaling and roles in liver homeostasis, injury and tumorigenesis [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148 (7): 1294 - 310

14 Chen C, Zhang HX, Wang M, *et al.* Stromal cells attenuate the cytotoxicity of imatinib on Philadelphia chromosome - positive leukemia cells by up - regulating the VE - cadherin/ $\beta$  - catenin signal [J]. *Leuk Res*, 2014, 38 (12): 1460 - 1468

15 Ali N, Yoshizumi M, Yano S, *et al.* The novel Src kinase inhibitor M475271 inhibits VEGF - induced vascular endothelial - cadherin and  $\beta$  - catenin phosphorylation but increases their association [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 102 (1): 112 - 120

16 Chang YM, Bai L, Liu S, *et al.* Src family kinase oncogenic potential and pathways in prostate cancer as revealed by AZD0530 [J]. *Oncogene*, 2008, 27 (49): 6365 - 6375

17 Vultur A, Buettner R, Kowolik C, *et al.* SKI - 606 (bosutinib), a novel Src kinase inhibitor, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7 (5): 1185 - 1194

18 Han R, Xiong J, Xiao R, *et al.* Activation of  $\beta$  - catenin signaling is critical for doxorubicin - induced epithelial - mesenchymal transition in BGC - 823 gastric cancer cell line [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34 (1): 277 - 84

(收稿日期: 2016 - 03 - 23)

(修回日期: 2016 - 03 - 30)