

miRNA - 145 调控靶基因 c - Myc 抑制胃癌增殖、侵袭

彭伟辉 黄江生 段伦喜 张磊屹 左仲坤 唐腾龙

摘 要 **目的** 探索 microRNA145 (miR - 145) 对胃癌细胞增殖活性的影响, 及与其靶基因 c - Myc 的调控关系。**方法** 选取人胃癌细胞株 SGC - 7901 作为研究对象, 并向细胞株内转染 miR - 145 模拟物和 miR - 145 阴性对照物, 荧光显微镜观察、Q - PCR 检测转染后细胞株 miR - 145 的变化, 并通过细胞软琼脂克隆增殖实验和 MTT 实验检测转染后 SGC - 7901 细胞株的增殖能力、Transwell 侵袭小室检测细胞侵袭能力。Western blot 法检测转染后 SGC - 7901 细胞株中 c - Myc 蛋白的表达情况。**结果** 转染后, miR - 145 模拟物组中 miR - 145 的表达明显高于 miR - 145 阴性对照和空白组, 转染 miR - 145 模拟物后 SGC - 7901 细胞增殖能力显著降低 ($P < 0.05$), c - Myc 蛋白表达也明显较低 ($P < 0.05$)。**结论** miR - 145 能通过抑制靶基因 c - Myc 的表达, 抑制胃癌细胞的增殖与侵袭能力。总之, miR - 145 可能在胃癌中发挥抑癌基因的作用, 是胃癌潜在的早期诊断指标和治疗靶点。

关键词 胃癌 miR - 145 c - Myc 增殖

中图分类号 R4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.05.015

miR - 145 Inhibite Tumor Proliferation and Invasion in Gastric Cancer by Targeting c - Myc. Peng Weihui, Huang Jiangsheng, Duan Lunxi, et al. The Department of Minimally Invasive Surgery, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Hunan 410000, China

Abstract Objective To investigate the effect of miR - 145 on proliferation of gastric cancer, And its relationship with target gene c - Myc. **Methods** Human gastric cancer cell line SGC - 7901 was selected as study object. miR - 145 mimic and miR - 145 NC were synthesised and transfected into SGC - 7901 cells. Q - PCR was used to detect the relative expression levels of miR - 145. The effects of miR - 145 on proliferation and invasion were detected by colony formation and MTT assay and Transwell invasion chambers. The expression of c - Myc were detected by Western blot. **Results** miR - 145 were successfully transfected into SGC - 7901 cells. The number of colony - forming units was obviously lower than the miR - 145 NC group and Normal group ($P < 0.05$). The expression of c - Myc protein in miR145 mimic group were significantly lower than miR - 145 NC group and Normal group ($P < 0.05$). **Conclusion** Therefore, we concluded that miRNA - 145 can inhibit cell proliferation and invasion, and the partial mechanism may relate to the inhibition of the expression of c - Myc protein. In brief, miRNA - 145 may play a role of cancer suppressor gene and it may become a new early diagnosis mark and therapy target in gastric cancer.

Key words Gastric cancer; miR - 145; c - Myc; Proliferation

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 在我国胃癌发生率和病死率排名第2, 其发生率一直呈上升趋势。据统计, 我国胃癌每年新发病例超过50万例, 占世界总发病例数的42%^[1]。手术仍是胃癌治疗的主要方法。但是随着放化疗、分子靶向治疗、免疫治疗等的发展, 胃癌的生存率得到极大的提高。胃癌的局部侵袭与远处转移是胃癌治疗失败以及死亡的主要原因^[2]。

microRNA (miRNA) 是一组21~23个核苷酸长的单链非编码RNA, 在进化上高度保守。他们由前

体RNA发夹结构与特征性Dicer组成^[3]。miRNAs能在转录后水平有效地抑制靶基因的表达, 是遗传控制网络和表观遗传修饰的重要信号通道之一。越来越多的研究证实miRNA在恶性肿瘤的发生、发展中起关键作用, 从而得到广泛的关注^[4]。miR - 145是非编码小RNA分子中重要一员, 位于人类染色体9q31, 研究显示miR - 145在结直肠癌、肺癌、胃癌、胰腺癌等多种实体肿瘤中表达异常, 发挥抑癌基因的促癌基因或者抑癌基因的作用^[5]。miR - 145可通过对多个靶基因, 如KRAS、c - Myc和FSCN1等作用, 调控肿瘤增殖^[6]。其中c - Myc是Myc基因家族中关键的原癌基因, 位于人类染色体8q24。研究表明c - Myc基因与胃癌、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、乳腺癌、宫颈癌等多种肿瘤发生、发展、耐药、侵袭、转移

基金项目: 湖南省科学技术厅基金资助项目 (2016JC2048)

作者单位: 410001 长沙, 中南大学湘雅二医院微创外科

通讯作者: 黄江生, 教授, 博士生导师, 电子信箱: Houston987@

163.com

等息息相关^[7]。C - Myc 基因的重排,过度表达或扩增可影响癌细胞的生长增殖、周期进程、以及细胞凋亡等过程^[8]。有研究证实 miRNA - 145 在胃癌中的表达水平下调,在胃癌中发挥抑癌基因的功能,但其具体机制以及与原癌基因 c - Myc 的相关性,值得进一步研究^[9]。

本研究选取人胃癌细胞株 SGC - 7901 作为研究对象,并向细胞株内转染 miR - 145 模拟物,观察细胞株的增殖、侵袭以及 c - Myc 蛋白表达的改变。以此探讨 miR - 145 对胃癌生物学行为的影响,及其与靶基因 c - Myc 的调控关系。

材料与方法

1. 主要材料:人胃癌细胞株 SGC - 7901 由中国科学院细胞研究生馈赠。RPMI1640 培养液、胎牛血清和胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司。LipofectamineTM2000 脂质体转染试剂和 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;噻唑蓝 (MTT) 试剂盒,细胞凋亡试剂盒购自美国 Sigma 公司;购自 has - mir - 145 模拟物、阴性对照表达载体由上海康城生物公司合成。

2. 方法:(1)miR - 145 细胞转染:miR - 145 细胞转染成熟体 miR - 145 模拟物 (mimics) 及阴性对照由上海康城生物公司合成。Mimics 序列:5' - ATCGTC - CAGTTTTCCCAG G - 3'/5' - CGCCTCCACACACT - CACC - 3';阴性对照序列:5' - ATTGGAACGATACA GAGAAGATT - 3'/5' - G GAACGCTTCACGAATTTG - 3'。采用 Lipo - 2000 转染试剂盒转染,实验设计 3 组:分别为 miR - 145 模拟物组、阴性对照组、空白对照组,转染 48h 后,Trizol 法提取各组细胞的 RNA,采用 Q - PCR 检测各组胃癌细胞中 miR - 145 表达变化。(2)软琼脂克隆形成实验检测细胞克隆能力:取代数期生长的各组细胞,胰酶消化并计数,调整细胞密度至 1×10^6 细胞/升。用蒸馏水分别制备出 1.2% 和 0.7% 两个浓度的低熔点琼脂糖液,高压灭菌后,维持在 40℃ 中不会凝固。按 1:1 比例使 1.2% 的琼脂糖和 2 × DMEM 培养基 (含有 2 × 抗生素和 20% 的小牛血清) 混合后,取 3ml 混合液注入直径 6cm 平皿中 (10cm 平皿加 7 ~ 10ml),冷却凝固,可作底层琼脂置 CO₂ 温箱中备用。按 1:1 比例让 0.7% 的琼脂糖和 2 × DMEM 培养基在无菌试管中相混以后,再向管中加入 0.2ml 的细胞悬液,充分混匀,注入铺有 1.2% 琼脂糖底层平皿中,逐形成双琼脂层。待上层琼脂凝固后,置入 37℃、5% CO₂ 温箱中培养 10 ~ 14 天。把平皿放置在倒置显微镜下,观察细胞克隆数。

计算形成率。实验重复 3 次。(3)MTT 法检测细胞增殖的影响:取代数期生长的各组细胞,胰酶消化并计数,以 1×10^3 个细胞/孔接种于 96 孔板中,每组设 5 个复孔。显微镜观察并调整细胞密度后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱连续培养 5 天。每天于培养终止前 4h 加入 20μl 浓度为 0.01mol/L 的 MTT 于孔中,4h 后完全吸去培养液,加 150μl 二甲基亚砷 (DMSO) 溶解甲瓚颗粒,振荡器振荡 5 ~ 10min,用酶标仪在 490nm 波长处测定其吸光度 (optical density, A) 值,即 A₄₉₀。计算各组细胞每天相对于第 1 天的增殖倍数 (A₄₉₀/fold),并以时间为横坐标,A₄₉₀/fold 为纵坐标绘制细胞增殖柱状图。(4)Transwell 侵袭小室检测细胞侵袭活力:取代数期生长的各组细胞,胰酶消化并计数,在均匀铺有 Matrigel 胶的 Transwell 上层小室加入 200μl 含有 5×10^4 细胞的无血清培养基,下层小室加入 500μl 含 10% 血清的培养基;置于 37℃、5% CO₂ 恒温箱孵育 24h,取出小室,PBS 洗 2 遍,用 4% 的多聚甲醛固定细胞 10min;PBS 再重复洗 2 遍,结晶紫染色 15min,PBS 洗 2 遍,用棉签小心的擦去上层小室的细胞,显微镜下随机取 8 个视野拍照记录。(5)Western blot 法检测 c - Myc 蛋白的表达:取代数期生长的各组细胞,胰酶消化,弃培养液后 PBS 冲洗细胞 3 次,加入预冷的 RIPA 裂解液 150μl,提取总蛋白。RIPA 裂解液预先加 PMSF 1.5μl 使终浓度为 1mmol/L。操作于冰上进行,4℃ 下 10000r/min (离心半径为 4cm) 离心 5min,取上清液。BCA 法测蛋白浓度后,99℃ 变性 10min。取 50μg 蛋白行 SDS - PAGE 电泳,印迹转移到 PVDF 膜上,封闭液中孵育 1h。加入 1:100 稀释的 c - Myc 一抗 4℃ 过夜。TBST 洗膜 5min,共 3 次。加入 1:5000 HRP 标记的二抗及 GAPDH,37℃ 孵育 2h。

3. 统计学方法:统计学方法每组实验至少重复 3 次,由 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,正态计量数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两样本均数间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析及 *q* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 miR - 145 mimic 细胞转染后对细胞中 miR - 145 表达的变化:转染 24 h 后,Q - PCR 结果也显示,miR - 145 在 miR - 145 模拟物组的表达量明显高于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。而阴性对照组和空白对照组间比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05,图 1)。mir - 145 模拟物在胃

癌 SGC-7901 细胞中成功转染。

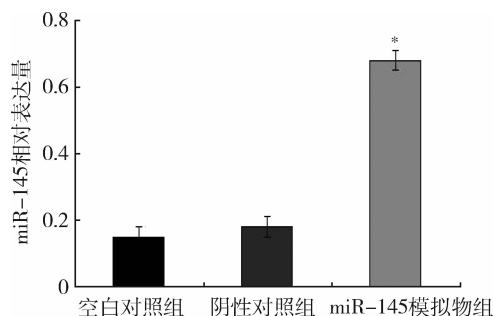


图 1 miR-145 转染后, 各组细胞 miR-145 相对表达量与阴性对照组和空白对照组比较, * $P < 0.05$

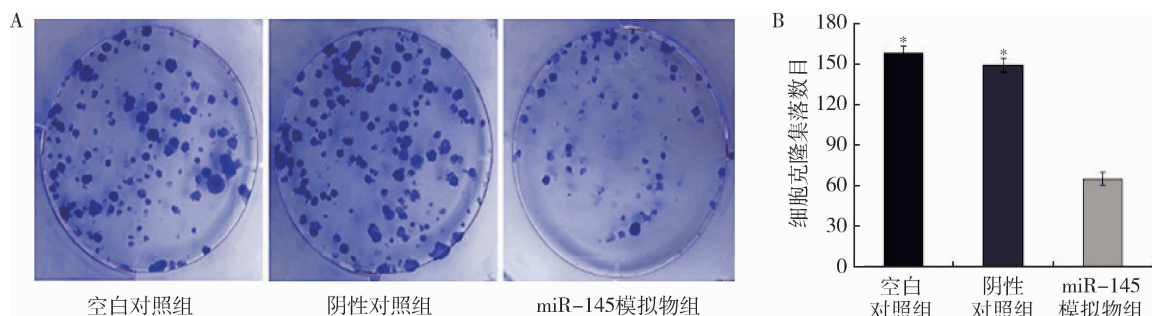


图 2 miR-145 转染后, 各组细胞克隆活性的改变

A. 镜下染色图; B. 各组集落形成单位数目。与 miR-145 模拟物组比较, * $P < 0.05$

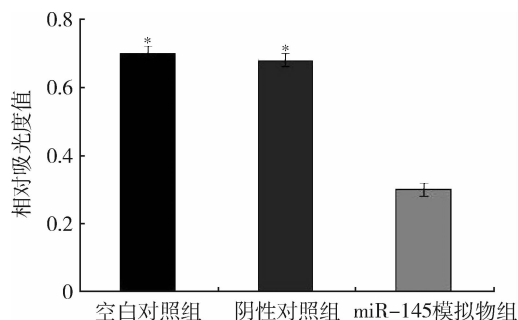


图 3 miR-145 转染后, 各组细胞的细胞增殖活性的改变与 miR-145 模拟物组比较, * $P < 0.05$

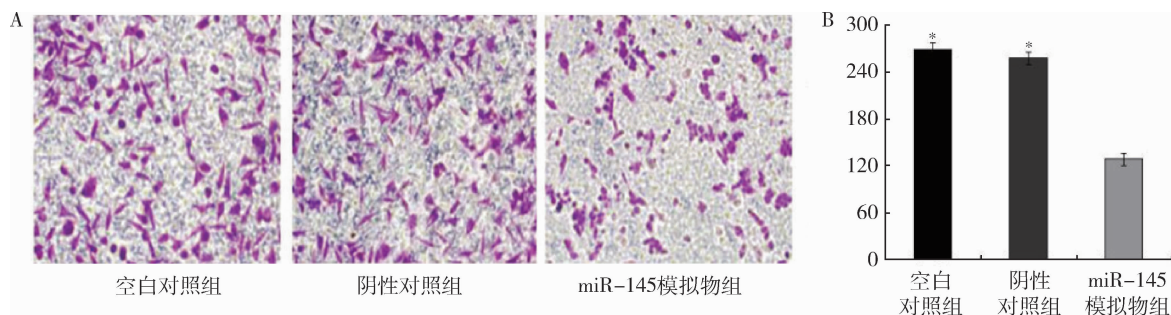


图 4 miR-145 转染后, 各组细胞侵袭能力的改变

与 miR-145 模拟物组比较, * $P < 0.05$

2. miR-145 抑制细胞克隆活性: 克隆形成实验结果显示, miR-145 模拟物组的细胞克隆集落形成单位数目明显低于阴性对照组和空白对照组 ($P < 0.05$, 图 2)。

3. miR-145 抑制细胞增殖活性: MTT 验结果显示, miR-145 模拟物组的中细胞增殖活力明显低于阴性对照组和空白对照组 ($P < 0.05$, 图 3)。

4. miR-145 抑制细胞侵袭活性: Transwell 小室结果显示, 相比较于阴性对照组和空白对照组, miR-145 模拟物组中穿过 Transwell 小室的胃癌 SGC-7901 细胞数明显降低 ($P < 0.01$, 图 4)。

5. miR-145 负调控 c-Myc 的表达: Western blot 法结果显示, miR-145 模拟物组中 c-Myc 蛋白的表达显著低于阴性对照组和空白对照组 ($P < 0.05$, 图 5)。

讨 论

microRNA 可通过与其调控靶基因的 3'UTR 互补结合, 或者直接降解靶基因的 mRNA, 从而抑制相关蛋白的翻译, 参与了各种相关疾病的发生与发展^[1]。而 miRNA 在肿瘤的研究更加深入, 越来越多的实验证明, 几乎每种肿瘤及其癌旁正常组织, 或者敏感肿

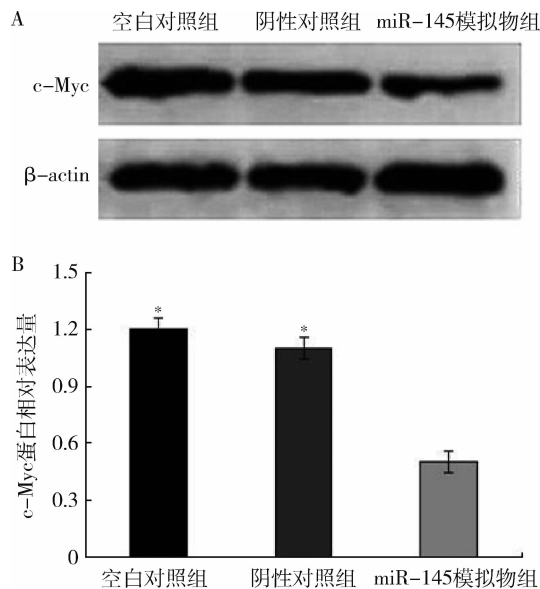


图5 miR-145 转染后,各组细胞 c-Myc 蛋白的表达水平

A. 灰度图;B. c-Myc 蛋白相对水平量。与 miR-145 模拟物组比较,* $P < 0.05$

瘤组织与耐药肿瘤组织,miRNA 的表达均存在显著的差异。miRNA 只有调控其靶基因发挥功能。每个 miRNA 调控着多个靶基因,靶基因也受多个 miRNA 的调控。研究表明,miRNA 其只占人体基因数的 2%,却调控着人体 30% 以上基因的表达。miRNA 与其靶基因形成了一张巨大的生物信息网,调控着机体的生长、发育、分化、凋亡等生理病理过程^[10]。所以,miRNA 及其调控的靶基因是当前肿瘤研究的热点。

miR-145 位于人类染色体 9q31,参与细胞的生长增殖、分化发育及凋亡等过程^[2]。在生理状态下,miR-145 能够促进肝脏分泌蛋白,miR-145 可以上调平滑肌标志蛋白的表达^[11,12]。miRNA 甚至对胚胎干细胞,核转录因子都有调节作用^[13]。在病理情况下,miR-145 主要参与了肿瘤的发生、发展,大多数研究表明,miR-145 在多种恶性肿瘤中表达下调,其中在肺癌、卵巢癌、结肠癌、宫颈癌、胃癌、结直肠癌的等多种实体瘤下调程度更加显著。这些研究表明,miR-145 可能作为一种新的抑癌基因对肿瘤的发生发展产生负调控作用^[14]。进一步的研究也证明,miR-145 可通过对多个靶基因,如 KRAS、c-Myc、FSCN1、OCT4 等的调控,发挥重要的抑癌作用,是癌症治疗的一个潜在靶点^[15]。原癌基因 c-Myc 是 miR-145 所调控的靶基因中的重要成员之一,定位于人类染色体 8q24。c-Myc 可编码转录调节因子,

具有 DNA 结合的活性,从而产生转录活化,促进细胞增殖的生理功能^[16]。研究表明 c-Myc 基因与多种肿瘤发生发展、肿瘤耐药相关。在胃癌、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、乳腺癌、宫颈癌等多种恶性肿瘤中,都可检测到 c-Myc 基因的重排、过表达或扩增现象,形成 c-Myc 蛋白过度表达。生理情况下,c-Myc 的高表达,可促进细胞转录活化,细胞增殖失控,从而导致肿瘤的产生;在恶性肿瘤中,c-Myc 的高表达仍可促进肿瘤细胞的周期进程,使肿瘤生长加速,侵袭加强,导致肿瘤的复发与转移,是肿瘤治疗的重要靶点^[17]。

在胃癌的研究中,越来越多证据表明,miR-145 在胃癌中显著低表达,而 c-Myc 蛋白处于高表达水平。miR-145 与 c-Myc 的调控异常可能是胃癌侵袭转移的关键^[18]。所以本研究选取高侵袭人胃癌细胞株 SGC-7901 作为研究对象,转染 miR-145 模拟物和 miR-145 阴性对照,观察 miR-145 对人胃癌细胞株 SGC-7901 的增殖与侵袭的影响,同时检测 c-Myc 蛋白的表达影响。本研究发现,miR-145 在人胃癌细胞株 SGC-7901 中处于相对低表达状态;软琼脂克隆形成实验以及 MTT 实验均显示过表达 miR-145 可显著抑制人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞克隆与增殖能力,Transwell 侵袭小室也显示过表达 miR-145 可显著抑制 SGC-7901 细胞的侵袭能力,并明显下调 c-Myc 蛋白的表达。

综上所述,miR-145 在胃癌中表达异常下调,miR-145 可以抑制胃癌的增殖能力,发挥抑癌基因的作用,而其机制可能与其负调控靶基因 c-Myc 的表达有关。总之,miR-145 是胃癌潜在的早期诊断指标和治疗靶点。接下来的实验中,笔者还将构建大鼠胃癌模型,研究 miRNA-145 对体内肿瘤的增殖抑制作用;并且进一步研究 miRNA-145 的靶基因,通过基因敲除或过表达该靶基因,进而构建稳定的细胞株,分析靶基因与 miRNA-145 之间的相互作用。另一方面,笔者将收集胃癌组织及其癌旁组织,胃癌原发灶以及转移灶,检测 miRNA-145 的相对表达量,为 miRNA-145 应用于胃癌的临床治疗提供实验依据。

参考文献

- 张雯,王金万. 胃癌的流行病学及其分型[J]. 中国全科医学, 2010,13(11):16-17
- 杨沫,王瑾瑜,芮景. 胃癌免疫治疗机制及应用的研究进展[J]. 山东医药,2017,57(10):103-106
- Wei D, Yang L, Lv B, et al. Genistein suppresses retinoblastoma cell viability and growth and induces apoptosis by upregulating miR-145

- and inhibiting its target ABCE1 [J]. Mol Vis, 2017, 23 (8): 385 - 394
- 4 李鹰飞, 高健伟, 王红. 微小 RNA - 200c 靶向抑制 EFNA1 基因对胃癌细胞增殖、凋亡及侵袭的影响 [J]. 山东医药, 2017, 57 (9): 16 - 19
 - 5 姜敏, 曾越灿, 吴荣. 替吉奥联合紫杉醇治疗晚期胃癌的疗效分析 [J]. 医学研究杂志, 2015, 44 (5): 52 - 56
 - 6 Meng MB, Jiang XD, Deng L, *et al.* Enhanced radioresponse with a novel recombinant human endostatin protein via tumor vasculature remodeling: experimental and clinical evidence [J]. Radiother Oncol, 2013, 106 (1): 130 - 137
 - 7 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (1): 5 - 29
 - 8 王棧山, 李继坤. Hedgehog 信号通路及 EMT 在进展期胃癌中的作用及意义 [J]. 医学研究杂志, 2013, 42 (9): 119 - 125
 - 9 齐泽铖, 朱成楚, 张波, 等. microRNA - 30b 在非小细胞肺癌中的表达及预后分析 [J]. 医学研究杂志, 2017, 46 (3): 63 - 65, 82
 - 10 Goto Y, Kurozumi A, Arai T. Impact of novel miR - 145 - 3p regulatory networks on survival in patients with castration - resistant prostate cancer [J]. Br J Cancer, 2017, 117 (3): 409 - 420
 - 11 Panda D, Saha P, Das T, *et al.* Target guided synthesis using DNA nano - templates for selectively assembling a G - quadruplex binding c - MYC inhibitor [J]. Nat Commun, 2017, 8 (3): 16103
 - 12 Broecker - Preuss M, Becher - Boveleth N, Bockisch A. Regulation of glucose uptake in lymphoma cell lines by c - MYC - and PI₃K - dependent signaling pathways and impact of glycolytic pathways on cell viability [J]. J Transl Med, 2017, 15 (1): 158
 - 13 李亚萍, 陈玉龙, 杨联河. 肿瘤中 miRNA - 21 及其对 PDCD4 和 PTEN 作用的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2017, 46 (3): 5 - 7
 - 14 李丹, 兰波, 康南, 等. lncRNA PCA3 高表达促进前列腺癌细胞增殖、迁移并抑制细胞凋亡 [J]. 医学研究杂志, 2017, 45 (6): 32 - 37
 - 15 Li C, Lu L, Feng B, *et al.* The lincRNA - ROR/miR - 145 axis promotes invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma via induction of epithelial - mesenchymal transition by targeting ZEB2 [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 4637
 - 16 Liu K, Xuekelati S, Zhang Y. Expression levels of atherosclerosis - associated miR - 143 and miR - 145 in the plasma of patients with hyperhomocysteinaemia [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2017, 17 (1): 163
 - 17 Attallah AM, El - Far M, Abdelrazek MA. Combined use of nuclear phospho protein c - Myc and cellular phosphoprotein p53 for hepatocellular carcinoma detection in high - risk chronic hepatitis C patients [J]. Br J Biomed Sci, 2017, 3 (5): 1 - 6
 - 18 Gu Y, Zhang J, Ma X. Stabilization of the c - Myc protein by CAMK II γ promotes T cell lymphoma [J]. Cancer Cell, 2017, 32 (1): 115 - 128

(收稿日期: 2017 - 07 - 28)

(修回日期: 2017 - 09 - 12)

贝壳杉烷型二萜类化合物 PV006 对 THP - 1 源性巨噬细胞 M1 型极化的调节作用

张加芬 李新宇 宋莎莎 王永芳

摘要 目的 利用体外诱导巨噬细胞向 M1 型极化的模式, 初探贝壳杉烷型二萜类化合物 PV006 对 M1 型极化的影响。**方法** 用佛波酯 (PMA) 联合脂多糖 (LPS) 及重组人干扰素 - γ (rhIFN - γ) 刺激人单核细胞株 THP - 1 细胞, 促使其向 M1 型巨噬细胞分化。通过显微镜观察细胞形态学变化, qRT - PCR 法检测诱导后的细胞内 IL - 1 β 、TNF - α 、IL - 6 以及 IL - 8 mRNA 表达水平, Western blot 法检测核转录因子 - κ B 磷酸化 P65 蛋白 (NF - κ B p - P65) 和磷酸化信号转导与转录激活物 1 (p - STAT1) 蛋白的表达, 确认 THP - 1 细胞向 M1 型极化, 同时检测 PV006 处理后对上述指标的影响。**结果** 经 PMA 联合 LPS 及 rhIFN - γ 诱导后, THP - 1 细胞形态由圆形转变为特征的长梭形或纺锤形, IL - 1 β 、TNF - α 、IL - 6、IL - 8 mRNA 表达升高, NF - κ B p - P65 和 p - STAT1 蛋白表达增强。不同浓度 PV006 同步处理后, 作 M1 型极化诱导的 THP - 1 细胞未出现特征性的长梭形或纺锤形, 大部分细胞仍为圆形。IL - 1 β 、TNF - α 、IL - 6、IL - 8 mRNA 表达水平下调 ($P < 0.05$), NF - κ B p - P65 和 p - STAT1 蛋白表达减弱。**结论** PMA 联合 LPS 及 rhIFN - γ 可诱导 THP - 1 源性巨噬细胞向 M1 型极化, PV006 有抑制巨噬细胞向 M1 型分化的作用。

关键词 巨噬细胞 M1 型极化 磷酸化核转录因子 - κ B P65 磷酸化信号转导与转录激活物 1

中图分类号 R75 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.05.016

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2017 - 12M - 1 - 011)

作者单位: 210042 南京, 中国医学科学院/北京协和医学院皮肤病研究所

通讯作者: 李新宇, 电子信箱: xinyusli609@163.com