

腺病毒介导 miRNA-138 抑制人胃癌 BGC-823 细胞增殖的机制研究*

范亚川¹, 梁光萍², 陈先华², 胡春燕³, 邹利全¹, 李学成¹, 陈陵^{1△}

(1. 中国人民解放军三二四医院消化内科, 重庆 400020; 2. 第三军医大学西南医院烧伤研究所, 重庆 400038; 3. 第三军医大学新桥医院肿瘤生物治疗中心, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨负载 miRNA-138(miR-138)的重组复制缺陷型腺病毒对人胃癌 BGC-823 细胞株增殖能力的影响及可能的机制。方法 将负载 miR-138 的重组腺病毒感染人胃癌 BGC-823 细胞株,采用荧光实时定量 PCR 检测 miR-138 表达丰度;采用 CCK8 方法检测细胞生长曲线;采用 Transwell 方法检测细胞侵袭能力。结果 与 Ad-LacZ 对照组相比,感染 Ad-miR138 后, BGC-823 细胞内 miR-138 表达丰度明显升高,差异有统计学意义(1.07 ± 0.07 vs. 4.89 ± 0.45 , $P < 0.05$);第 6 天吸光度明显下降,差异有统计学意义(0.52 ± 0.06 vs. 0.77 ± 0.06 , $P < 0.05$);细胞侵袭能力亦显著下降,差异有统计学意义(32.00 ± 11.00 vs. 56.00 ± 12.00 , $P < 0.05$)。结论 miR-138 体外可显著抑制人胃癌 BGC-823 细胞增殖及侵袭能力。

关键词:腺病毒科;胃肿瘤;微 RNAs

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.06.015

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)06-0679-02

Inhibitive effect of adenovirus-mediated miRNA-138 on proliferation of gastric carcinoma cell line BGC-823 in vitro*Fan Yachuan¹, Liang Guangping², Chen Xianhua², Hu Chunyan³, Zou Liquan¹, Li Xuecheng¹, Chen Ling^{1△}

(1. Department of Gastrointestinal, 324th Hospital of PLA, Chongqing 400020, China;

2. Institute of Burn Research, Southwest Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

3. Cancer Biotherapy Center, Xinqiao Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of the replication-deficient adenovirus carrying miR-138(Ad-miR138) on the proliferation of human gastric cancer cell line BGC-823 and the possible mechanism. **Methods** The human gastric cancer cell line BGC-823 was infected with Ad-miR138. Then the expression level of miR-138 was measured by RT-PCR. The growth curve of BGC-823 was measured using CCK-8 method. The ability of cell invasion was measured using Transwell chambers. **Results** After infected with Ad-miR138, the expression of miR-138 in BGC-823 cells was up-regulated significantly (1.07 ± 0.07 vs. 4.89 ± 0.45 , $P < 0.05$). Absorbance of the 6th day decreased significantly (0.52 ± 0.06 vs. 0.77 ± 0.06 , $P < 0.05$), and the invasion ability was decreased obviously (32.00 ± 11.00 vs. 56.00 ± 12.00 , $P < 0.05$). **Conclusion** miR-138 can effectively suppress the proliferation and invasion of human gastric cancer cell line BGC-823 in vitro.

Key words: adenoviridae; stomach neoplasms; microRNAs

胃癌是全球肿瘤中发病率、致死率最高的肿瘤之一,传统手术、化疗及放疗疗效欠佳^[1],5 年生存率不到 30%^[2],因此需要深入研究胃癌发病机制并开发新的治疗模式^[3]。随着 miRNA(miR)的功能的揭示,miRNA 在肿瘤早期诊断^[4]及治疗^[5]中的作用日益受到重视。笔者在前期研究中发现,miR-138 在胃癌进展过程中呈逐步下降趋势,且其表达与 hTERT 呈负相关^[6],而 hTERT 可促进胃癌发生、发展^[7-8]。国外有研究亦发现,miR-138 可通过抑制甲状腺癌内 hTERT 蛋白表达而抑制甲状腺癌细胞生长^[9]。在成功包装负载 miR-138 的腺病毒^[10]基础上,本研究拟进一步探讨 miR-138 过表达对人胃癌 BGC-823 细胞增殖及侵袭能力的影响及可能的作用机制,现报道如下。

1 资料与方法**1.1 一般资料** 人胃癌 BGC-823 细胞株(中科院上海生科院细胞资源中心),DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)及胰蛋白酶(HyClone),负载有 miR-138 表达序列的复制缺陷型腺病毒(Ad-miR138),由本室构建并保存^[10];负载有 β -半乳糖苷酶(β -gal)基因 LacZ 的复制缺陷型腺病毒,由西南医院心内科唐兵博士惠赠。mirVanaTM miRNA 提取试剂盒(Ambion),逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(TaKaRa);ABI7500 荧光定量 PCR 仪(ABI);CCK-8 检测试剂盒(碧云天);Transwell 小室(Corning)。
1.2 方法**1.2.1 BGC-823 细胞培养** 采用含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。**1.2.2 Ad-miR138 感染人胃癌细胞 BGC-823** 取对数生长长期的 BGC-823 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,以 PBS 代替腺病毒作为空白对照(BGC-823 组);感染 Ad-LacZ 的阴性对照

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30900679);重庆市自然科学基金资助项目(cstc2011jjA10111, cstc2011jjA10114, cstc2012jjA10145)。作者简介:范亚川(1964-),副主任医师,本科,主要从事 miRNA 在消化系统肿瘤发生、发展的作用及机制研究。△ 通讯作者, Tel:(023)68762092; E-mail:lingcong_008@126.com。

(BGC823-AdLacZ 组);感染 Ad-miR138 的 BGC823-AdmiR138 组。腺病毒感染步骤参照文献[10]进行。感染后 48 h 收集各组细胞用于后续实验。

1.2.3 实时定量-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 miR-138 表达 提取细胞 miRNA, 逆转录 cDNA, 配好 RT-PCR 反应体系后, 于 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应, 退火温度为 60 ℃。相对定量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行计算, 引物序列见表 1。

1.2.4 CCK-8 方法检测胃癌细胞增殖 感染腺病毒 48 h 后收集各组细胞, 以每孔 2.5×10^3 个细胞, 接种于 96 孔板中, 共检测 6 次, 每天 1 次, 每个时间点设置 3 个复孔。检测前每孔分别加入 20 μ L CCK-8 试剂, 避光 37 ℃ 孵育 2 h, 轻轻振荡后, 酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度(A)值, 并比较各组细胞的 A 值, 观察 miR-138 对胃癌细胞增殖的影响并计算抑瘤率。抑瘤率 = (1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值) \times 100%。

表 1 RT-PCR 及 PCR 引物列表

引物	基因名称	引物序列
RT-PCR 引物	U6	5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'
	miR-138	5'-GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTTCG-GCAATTCGACTGGATACGACCGCCCTG-3'
PCR 引物	U6	F:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3' R:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'
	miR-138	F:5'-GGGAGCTGGTGTGTGAAT-3' R:5'-CAGTGCGTGTCTGGAGT-3'

F:正向引物;R:反向引物。

1.2.5 Transwell 小室检测胃癌细胞侵袭能力 感染腺病毒 48 h 后收集各组细胞, 用无血清的 DMEM 培养液悬浮细胞, 稀释成 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞密度, 加入 200 μ L 细胞悬液至 Transwell 上室, 下室加入 800 μ L 的含 10% 血清的 DMEM 培养液, 37 ℃ 孵育 24 h 后, 乙醇棉球拭去上室未迁移细胞, 经 95% 乙醇固定后, 1% 结晶紫染色 3 min。采用显微镜观察细胞迁移情况, 实验重复 3 次。随机取 5 个 200 倍视野, 计数侵袭的细胞, 取平均值。

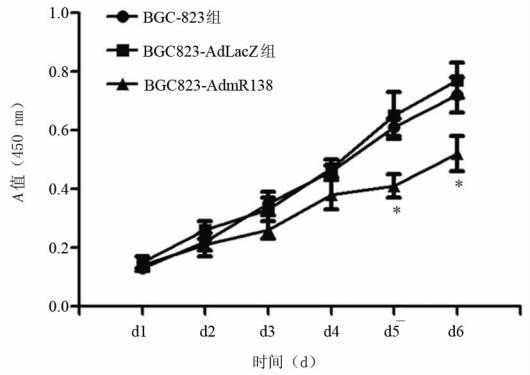
1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 Ad-miR138 感染 BGC-823 细胞后 miR-138 的表达 与 BGC823-AdLacZ 组相比, BGC823-AdmiR138 组细胞内 miR-138 表达丰度显著上调 (1.07 ± 0.07 vs. 4.89 ± 0.45), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

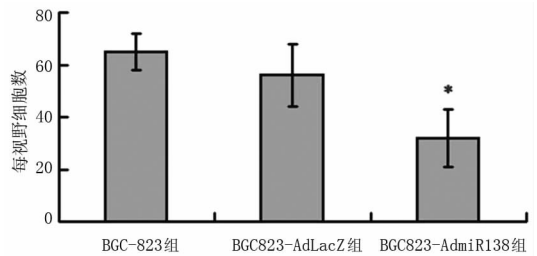
2.2 CCK-8 检测细胞生长曲线 采用 CCK-8 检测细胞生长曲线。与对照组相比, BGC823-AdmiR138 组细胞增殖受到明显抑制。在第 5、6 天, BGC823-AdmiR138 组 A 值显著低于对照组 (5 d: 0.41 ± 0.04 vs. 0.65 ± 0.08 ; 6 d: 0.52 ± 0.06 vs. 0.77 ± 0.06), 第 5、6 天抑瘤率分别为 36.9%、32.5%。

2.3 Ad-miR138 感染对胃癌 BGC-823 细胞侵袭能力的影响 与 BGC823-AdLacZ 组相比, Ad-miR138 实验组细胞侵袭能力显著下降 (56 ± 12 vs. 32 ± 11), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。



*: $P < 0.05$, 与 BGC823-AdLacZ 组比较。

图 1 CCK-8 检测 BGC-823 细胞生长曲线



*: $P < 0.05$, 与 BGC823-AdLacZ 组比较。

图 2 Transwell 小室检测胃癌细胞侵袭能力

3 讨 论

新近研究发现, miR-138 是一重要的抑癌 miRNA, 可通过靶向多个癌基因抑制肿瘤生长, 例如在肝癌细胞株内 miR-138 功能模拟物可抑制靶基因 CCND3 而在体外及小鼠体内抑制肝细胞癌的生长与转移^[11]。miR-138 还可通过 BCR-ABL/GATA1/miR-138 环路, 抑制慢性髓样白血病细胞株增殖, 促进其凋亡^[12]。还有研究发现, 在肾透明细胞癌细胞株 786-0 内, miR-138 可抑制靶基因 HIF-1 α 表达而促进肾癌细胞凋亡并抑制其侵袭能力^[13]; 并且, miR-138 还可通过抑制其靶基因 P-糖蛋白, Bcl-2 以及多种耐药基因-1, 逆转白血病细胞株 HL-60 的耐药性^[14]。这些结果表明, miR-138 是一个重要的抑癌 miRNA。笔者前期研究亦发现, 转染 miR-138 功能模拟物 RNA 后, 人胃腺癌细胞株 SGC-7901 增殖能力显著抑制^[15]。由于 miR-138 功能模拟物 RNA 易降解, 作用时间短。

本研究采用 Ad-miR138 感染人胃癌 BGC-823 细胞株, 发现 Ad-miR138 可明显上调细胞内 miR-138 表达丰度, 并显著抑制 BGC-823 细胞的增殖及侵袭能力。因此, 以抑癌 miR-138 作为胃癌治疗靶标的策略是可行的。并且, 由于 miR-138 可通过多种机制抑制肿瘤生长与增殖, 并可逆转肿瘤细胞对化疗药物的耐药性^[14], 因此极可能成为优良的抗肿瘤治疗靶标。

参考文献:

- [1] 张立贵. 影响胃癌根治术后预后相关因素分析[J]. 海南医学院学报, 2013, 19(10): 1438-1440, 1444.
- [2] Shi Y, Zhou Y. The role of surgery in the treatment of gastric cancer[J]. J Surg Oncol, 2010, 101(8): 687-692.
- [3] 孙杰, 潘赛英, 陈倩琪, 等. 曲妥珠单抗联合 FOLFIRI 治疗 HER2 阳性晚期胃癌的疗效观察[J]. (下转第 683 页)

- C_2 laminar screws: case series and technical note[J]. *J Spinal Disord*, 2004, 17(2): 158-162.
- [2] Patel AJ, Cherian J, Fulkerson DH, et al. Computed tomography morphometric analysis for translaminar screw fixation in the upper thoracic spine of the pediatric population[J]. *J Neurosurg Pediatr*, 2011, 7(4): 383-388.
- [3] Ma XY, Yin QS, Wu ZH, et al. C_2 anatomy and dimensions relative to translaminar screw placement in an Asian population[J]. *Spine*, 2010, 35(6): 704-708.
- [4] Joshua J, Chern MD. Computed tomography morphometric analysis for axial and subaxial translaminar screw placement in the pediatric cervical spine[J]. *J Neurosurg Pediatr*, 2009, 3(2): 121-128.
- [5] Alvin MD, Abdullah KG, Steinmetz MP, et al. Translaminar Screw fixation in the subaxial cervical spine: Quantitative laminar analysis and feasibility of unilateral and bilateral translaminar virtual screw placement[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2012, 37(12): E745-751.
- [6] Mueller CA, Roessler L, Podlogar M, et al. Accuracy and complications of transpedicular C_2 screw placement without the use of spinal navigation[J]. *Eur Spine J*, 2010, 19(5): 809-814.
- [7] Neo M, Sakamoto T, Fujibayashi S, et al. The clinical risk of vertebral artery injury from cervical pedicle screws inserted in degenerative vertebrae[J]. *Spine*, 2005, 30(24): 2800-2805.
- [8] Yoshida M, Neo M, Fujibayashi S, et al. Comparison of the anatomical risk for vertebral artery injury associated with the C_2 -pedicle screw and atlantoaxial transarticular screw[J]. *Spine*, 2006, 31(15): E513-517.
- [9] Hong JT, Sung JH, Son BC, et al. Significance of laminar screw fixation in the subaxial cervical spine[J]. *Spine*, 2008, 33(16): 1739-1743.
- [10] Wang MY. Cervical crossing laminar screws: early clinical results and complications[J]. *Neurosurgery*, 2007, 61(5 Suppl 2): 311-316.
- [11] Jang SH, Hong JT, Kim IS, et al. C_7 posterior fixation using intralaminar screws: early clinical and radiographic outcome[J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2010, 48(2): 129-133.
- [12] Abuzayed B, Tutunculer B, Kucukyuruk B, et al. Anatomic basis of anterior and posterior instrumentation of the spine: morphometric study[J]. *Surg Radiol Anat*, 2010, 32(1): 75-85.
- [13] Chen Y, Zeng J, Guan J, et al. Reformatted computed tomographic evaluation of the thoracic pedicle in a Chinese population for the surgical application of transpedicular screw placement[J]. *Surg Radiol Anat*, 2010, 32(5): 463-468.
- [14] Xu R, Burqar A, Ebraheim NA, et al. The quantitative anatomy of the laminae of the spine[J]. *Spine*, 1999, 24(2): 107-113.
- [15] 曹进, 徐荣明, 仲肇平, 等. C_7 后路椎板螺钉固定解剖学可行性研究[J]. *中国骨伤*, 2010, 23(4): 282-285.

(收稿日期: 2013-10-05 修回日期: 2013-12-17)

(上接第 680 页)

- 南方医科大学学报, 2011, 31(8): 1458-1460.
- [4] 赵苏瑛, 吴倩, 高峰, 等. 血清 miR-155 水平检测在乳腺肿瘤患者早期诊断中的研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(13): 1569-1571.
- [5] 孔飞飞, 邱欣欣, 陈光辉, 等. 靶向 YB-1 的 microRNA 表达载体的构建及其对 MB-MDA-231 细胞增殖的影响[J]. *激光杂志*, 2011, 32(4): 67-69.
- [6] 李学成, 王宗华, 梁光萍, 等. miR-138 在胃黏膜癌变过程中的表达及意义[J]. *临床检验杂志*, 2011, 29(7): 520-522.
- [7] 陈陵, 陈婷, 蔡永国, 等. 胃黏膜癌变过程中 hTERT 和相关基因表达的变化及其临床意义[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2006, 15(5): 443-447.
- [8] Yu ST, Chen L, Wang HJ, et al. hTERT promotes the invasion of telomerase-negative tumor cells in vitro[J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(2): 329-336.
- [9] Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, et al. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(2): 280-286.
- [10] 熊晓峰, 陈陵, 范亚川, 等. 负载 hTERT 调控相关 miR-138 复制缺陷型腺病毒的包装及鉴定[J]. *重庆医学*, 2011, 40(9): 896-898.
- [11] Wang W, Zhao LJ, Tan YX, et al. MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(5): 1113-1120.
- [12] Xu C, Fu H, Gao L, et al. BCR-ABL/GATA1/miR-138 mini circuitry contributes to the leukemogenesis of chronic myeloid leukemia[J]. *Oncogene*, 2012, 2012: 557.
- [13] Song T, Zhang X, Wang C, et al. MiR-138 suppresses expression of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) in clear cell renal cell carcinoma 786-0 cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(5): 1307-1311.
- [14] Zhao X, Yang L, Hu J, et al. miR-138 might reverse multidrug resistance of leukemia cells[J]. *Leuk Res*, 2010, 34(8): 1078-1082.
- [15] 陈陵, 梁光萍, 邹利全, 等. miR-138 对人胃腺癌细胞 SGC-7901 增殖的影响[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(13): 755-758.

(收稿日期: 2013-09-18 修回日期: 2013-11-22)