

microRNA-219-2-3p 在胃癌中的表达及其作用机制初探

金锦莲, 吴发明, 周海燕, 谢晓晶, 王新宇

(三峡大学第三临床医学院/葛洲坝中心医院消化内科, 湖北宜昌 443002)

摘要:目的 探讨 microRNA-219-2-3p(miR-219-2-3p)与胃癌的相关性及机制。方法 运用实时聚合酶链反应(real time-RT-PCR)检测 82 份配对的胃癌组织和周围正常组织样本中的 miR-219-2-3p 的表达水平。在胃癌细胞株 MGC803 中过表达 miR-219-2-3p 后,测定细胞增殖活性,并在细胞株和胃癌组织标本中采用蛋白免疫印迹法(Western blot)测定与肿瘤增殖相关的蛋白 ERK1/2 表达水平。结果 miR-219-2-3p 在晚期胃癌组织中的表达量下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在胃癌细胞株 MGC803 中过表达 miR-219-2-3p 后细胞增殖受显著抑制($P < 0.05$)。过表达 miR-219-2-3p 后,MGC803 细胞中的 ERK 磷酸化水平显著下降,总 ERK 表达量不变。在组织标本中,胃癌组织的 ERK 磷酸化(p-ERK)水平明显高于周围癌旁组织。结论 miR-219-2-3p 可能通过参与调控 ERK1/2 信号通路而在胃癌发生和发展中起抑癌基因的作用。

关键词: 胃肿瘤;microRNA-219-2-3p;细胞分裂

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.14.017

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)14-1729-03

The role of microRNA-219-2-3p in Gastric Cancer and the underlying mechanism

Jin Jinlian, Wu Faming, Zhou Haiyan, Xie Xiaojing, Wang Xinyu

(The Third Clinical Medical College of China Three Gorges University/Gastrointestinal Department of Internal Medicine Gezhouba Dam group Central Hospital, Hubei Yichang 443002)

Abstract: Objective To evaluate the role of miR219-2-3p in gastric cancer and the underlying mechanisms. Methods Real time RT-PCR was employed to quantify the expression level of miR219-2-3p in matched tissues of 82 patients. In vitro cell proliferation, the expression of tumorigenesis related protein ERK1/2 was performed by overexpressing miR-219-2-3p in gastric cancer cell line MGC803. Results The expression level of miR-219-2-3p significantly decreased in late stage gastric cancer ($P < 0.05$). The cell proliferation rate was significantly reduced in gastric cancer cell lines overexpressing miR-219-2-3p. Furthermore, the expression level of p-ERK that activated form of ERK was significantly decreased whereas the total level of ERK was unchanged after overexpressing of miR-219-2-3p in MGC803 cell lines. The expression level of p-ERK was also increased in gastric cancer tissues. Conclusion miR-219-2-3p may acts as a tumor suppressor in gastric cancer by decreasing the activity of ERK1/2 signaling pathway.

Key words: stomach neoplasms; microRNA-219-2-3p; cell division

胃癌是世界上的第四大常见肿瘤,在肿瘤死亡原因中排名第二。目前,研究表明晚期胃癌患者中只有约 20% 的患者生存期超过 5 年^[1]。肿瘤的发生、发展是多种内源性和外源性因素累积的结果。胃癌的发生的内源性因素通常与饮食习惯和胃部幽门螺杆菌感染率增加有关^[2],外源性因素则包括遗传、饮食、胃泌素激素水平以及其他慢性胃部炎症因子等^[3]。

microRNA(miRNA)是一种非编码的小片段 RNA,参与 mRNA 的降解和翻译调控。miRNA 通过靶向结合于 mRNAs 的 3' 非翻译区互补序列从而诱导 mRNA 降解或抑制翻译,起到对基因转录和翻译的调节作用^[4]。近年来,miRNAs 被认为是一种肿瘤抑制基因,其通过对基因表达的调节而对肿瘤的发生和发展起着重要作用^[5]。在人类和鼠中,miRNA-219(miR-219)前体转录产物主要是由 miR-219-1 和 miR-219-2 基因编码。前体转录产物经过剪切后成为成熟的 miRNAs,包括从前体转录产物的 5' 端转录的 miR-219-5p;分别从 miR-219-1 前体转录成熟的 miR-219-1-3p 和 miR-219-2 前体转录成熟的 miR-219-2-3p。已有研究表明在恶性星形细胞瘤^[6]和肝癌中 miR-219-5p 表达量下降^[7],最新的研究报道,miR-219-2-3p 在胃癌细胞系 MGC-803 中表达量有所降低,且过表达 miR-219-2-3p 可以诱导胃癌细胞的凋亡,提示 miR-219-2-3p 可能作为胃癌的候选抑癌基因^[8]。

基于以上研究背景,本研究拟对本院 2011~2012 年进行手术治疗的胃癌患者组织中 miR-219-2-3p 表达量的变化及其可能作用机制进行研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011~2012 年在本院接受胃癌切除手术的 82 例胃癌患者,所纳入的患者均签订了知情同意书。在病理医师的指导下,切除适量的胃癌组织以及邻近的癌旁组织(距离癌组织 3 cm)。手术切除后的新鲜标本立即置于液氮中冷冻保存。所有患者年龄 45~70 岁。所有胃癌标本均经过病理诊断确认。

1.2 方法

1.2.1 实时聚合酶链反应(real-time RT-PCR) 组织中总 RNA 抽提采用 Trizol(Takara)试剂盒方法。采用 Taqman miRNA 的方法并通过 real-time RT-PCR 技术定量检测 82 例胃癌病例中癌组织和邻近正常组织的 miR-219-2-3p 表达水平。逆转录反应体系为:5×RT buffer,0.1 M DTT,200 U/mL 逆转录酶,40 U/mL RNase 抑制剂。反应条件为 37 °C 条件下 55 min,70 °C 条件下 15 min,-20 °C 保存。在 ABI 公司生产的 7500 real-time PCR 仪上进行反应,反应体系为 20 μL,包括 1 μL 逆转录产物,1×Universal TaqMan Master Mix 和 1×Taqman probe/primer Mix(Invitrogen)。

1.2.2 细胞培养及转染实验 本研究采用的细胞株为人胃癌细胞株 MGC803(胃黏液癌,低分化),购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心(北京)。培养基:DMEM 培养液(Gibco 公司),10% 胎牛血清(Gibco 公司)和链霉素(100 mg/mL),青霉素(100 U/mL)。在 5% CO₂,湿度大于 95% 的 37 °C 培养箱中培养。转染前 24 h 分别于 6 孔板接种 2×10⁵/孔。24 h 后(约 80% 细胞贴壁后)进行转染,参照 Lipofectamine TM2000 说明书及参考文献进行操作^[9]。转染 6~8 h 后换液,培养 48 h 后裂解细胞,并进行相关指标分析。

1.2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)分析 将 MGC803 的全细胞成分及标本组织匀浆用细胞裂解缓冲液裂解。裂解缓冲液的成份为 20 mM Tris-HCl、1 mM 乙二胺四乙酸(EDTA)、1 mM 乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA)、1 mM 钒酸钠、0.2 mM。收集蛋白并进行蛋白浓度测定(BCA 法)。制备好的蛋白样品放置于 -80 °C 冰箱保存备用。电泳:每泳道上样 10 μg 蛋白。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转硝酸纤维素膜。转膜后封闭非特异性结合蛋白。然后加入一抗 4 °C 孵育过夜,加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h。ECL 显色拍片。一抗包括 ERK1/2、p-ERK、β-actin。

1.2.4 细胞增殖测定 各组细胞分别转染 miR-219-2-3p, miRNA 阴性对照,转染后的细胞用含 10% CCK-8 的(Dojindo;日本)培养基在 37 °C 孵育,可以视觉上看到颜色变化。分别于转染后 0、24、48、72、96 h 在 450 nm 和 630 nm 波长处测定吸光度,计算细胞增殖速率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据处理。miRNA 的 real-time PCR 结果采用 2^{-ΔΔCt} 方法对目的基因在癌组织及癌旁组织中的表达量进行相对定量分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析或 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中 miR-219-2-3p 的表达变化与临床病理参数的关系分析 与癌旁组织比较,59.7% (49/82) 肿瘤组织中 miR-219-2-3p 表达量降低。作者进一步对 miR-219-2-3p 表达与临床病理特征的关联性进行分析,结果如表 1,miR-219-2-3p 在胃癌组织中的表达与临床分期相关性表现为,miR-219-2-3p 表达量越低,患者临床分期级别越高(*P* < 0.05),而与年龄、性别、癌变部位、Lauren's 分类、淋巴结侵袭无关(*P* > 0.05)。

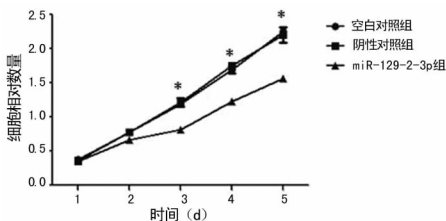


图 1 miR-219-2-3p 过表达对 MGC803 细胞增殖影响

2.2 miR-219-2-3p 对胃癌细胞增殖的影响 由图 1 细胞增殖实验结果可知,与空白对照组(未经任何处理)及阴性对照组(转染空质粒)相比,在 MGC803 细胞过表达 miR-219-2-3p 后(miR-219-2-3p 组),细胞数目显著降低,且具有时间效应关系,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

2.3 miR-219-2-3p 过表达对 ERK 表达的影响 与阴性对照组相比,过表达 miR-219-2-3p 后,细胞水平的磷酸化 ERK1/2

(p-ERK)表达水平显著降低,而总磷酸化水平没有显著改变,图 2。与癌旁组织相比,胃癌组织中 p-ERK 蛋白表达量显著升高,见图 3。

表 1 MiR-219-2-3p 表达量与胃癌临床病理参数相关性分析

组别	<i>n</i>	miR-219-2-3p	<i>P</i>
年龄(岁)			0.132
>55	60	-0.323(-0.918~+0.091)	
<55	22	-0.416(-0.956~+0.708)	
性别			0.823
男	45	-0.356(-1.097~+0.927)	
女	37	-0.392(-1.323~+0.410)	
癌变部位			0.098
近端	15	-0.133(-1.789~+0.341)	
胃体	42	-0.45(-1.309~+0.855)	
远端	25	-0.276(-1.044~+1.121)	
Lauren's 分类			0.199
弥漫型	42	0.155(-0.806~+0.178)	
混合型	40	-0.007(-0.701~+1.264)	
临床分期			0.039
I~II	51	0.366(-0.420~+1.195)	
III~IV	31	-0.578(-2.283~+1.268)	
淋巴结侵袭			0.115
N0~N1	44	0.309(-1.324~+2.192)	
N2~N3	38	-0.472(-2.226~+1.282)	

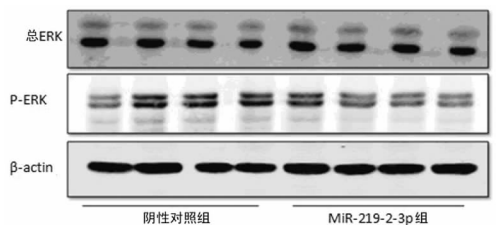


图 2 MGC803 细胞中过表达 miR-219-2-3p 对细胞中 P-ERK 水平影响

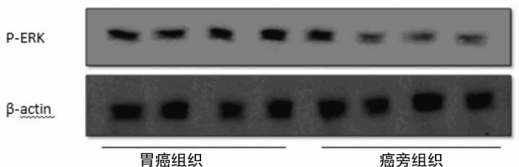


图 3 胃癌组织和癌旁组织中 P-ERK 水平检测

3 讨论

miRNA 是一类小的非编码 RNA 分子,由 21~23 个碱基组成。miRNA 在真核基因表达调控中有着广泛的作用,大多数已知的 miRNA 分子都是和基因的负向调节相关。研究表明,miRNA 可作为参与调控基因表达的分子,基于其靶 mRNA 分子,miRNA 可以在肿瘤的发生和发展中起到“促进因子”或是“抑制因子”的作用^[10-11]。胃癌中存在多种 miRNA 表达的异常,这些 miRNA 通过对肿瘤相关靶基因的调控发挥作用,在胃癌的发生、发展及其转移等过程中进行分子水平调控,影响胃癌的最终发展和转归^[12]。因此,对胃癌中特异的 miR-

NA 进行的研究可为胃癌的临床诊治提供重要的科学理论依据。

本文首先研究了 miR-219-2-3p 表达水平和胃癌的相关性。首先,运用 real-time PCR 的方法对胃癌组织及癌旁组织的 miR-129-2-3p 表达量进行了测定,并通过统计学的方法对不同阶段不同类型的胃癌与 miR-219-2-3p 表达作了相关性分析,结果表明 miR-219-2-3p 水平在晚期胃癌中显著下降。在胃癌细胞系 MGC803 中过表达 miR-219-2-3p 后可抑制细胞的增殖速率,提示 miR-219-2-3p 可能是一种肿瘤抑制因子。针对上述的实验结果,作者进一步探讨了 miR-219-2-3p 可能存在的抑制肿瘤发生发展的机制。已有的研究表明 ERK 信号通路的激活在多种肿瘤组织中被激活,例如胃癌^[13]、胰腺癌^[14]、肺癌^[15]。而目前在肿瘤细胞系上的相关研究也表明 ERK 信号通路的激活对肿瘤细胞的转移有着调控作用^[16]。为了研究 miR-219-2-3p 在胃癌中的作用是否与 ERK 信号通路相关,本研究在胃癌细胞系 MGC803 中过表达 miR-219-2-3p,结果发现 p-ERK 表达水平相比于空白对照组与阴性对照组显著地下降,而总的 ERK 的表达量不变。说明在胃癌细胞系中过表达 miR-219-2-3p 抑制了 ERK 信号通路。同时,在胃癌组织样本中,其 p-ERK 表达水平相对于周围癌旁组织也有显著上升。因此,miR-219-2-3p 可能是通过下调 ERK 信号通路的活性从而产生对胃癌细胞的抑制作用。

参考文献:

- [1] Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments[J]. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2004, 3: 1-26.
- [2] 张思维,雷正龙,李光琳,等. 中国肿瘤登记地区 2006 年肿瘤发病和死亡资料分析[J]. *中国肿瘤*, 2010, 19(6): 356-365.
- [3] Yasui W, Oue N, Sentani K, et al. Transcriptome dissection of gastric cancer; identification of novel diagnostic and therapeutic targets from pathology specimens [J]. *Pathol Int*, 2009, 59(3): 121-136.
- [4] Zamboni CF, Basso D, Navaglia F, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(1): 382-384.
- [5] Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(5): 517-529.
- [6] Ambros S, Preuitt RL, Yi M, et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microR-

NA expression in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(15): 6162-6170.

- [7] Rao SA, Santosh V, Somasundaram K. Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma[J]. *Mod Pathol*, 2010, 23(10): 1404-1417.
- [8] Huang N, Lin J, Ruan J, et al. MiR-219-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting glypican-3[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(6): 884-891.
- [9] Lei H, Zou D, Li Z, et al. MicroRNA-219-2-3p functions as a tumor suppressor in gastric cancer and is regulated by DNA methylation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): 1-11.
- [10] Liu R, Li J, Teng Z, et al. Overexpressed microRNA-182 promotes proliferation and invasion in prostate cancer PC-3 cells by down-regulating N-myc downstream regulated gene 1(NDRG1)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): 1-10.
- [11] Thomson JM, Newman M, Parker JS, et al. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(16): 2202-2207.
- [12] Merritt WM, Lin YG, Han LY, et al. Dicer, drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(25): 2641-2650.
- [13] Nobili S, Bruno L, Landini I, et al. Genomic and genetic alterations influence the progression of gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(3): 290-299.
- [14] Shen XJ, Wang HB, Ma XQ, et al. β , β -Dimethylacrylylshikonin induces mitochondria dependent apoptosis through ERK pathway in human gastric cancer SGC-7901 cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): 417-423.
- [15] Kohno M, Pouyssegur J. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy[J]. *Ann Med*, 2006, 38(3): 200-211.
- [16] Pinhel IF, Macneill FA, Hills MJ, et al. Extreme loss of immunoreactive p-Akt and p-Erk1/2 during routine fixation of primary breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(5): 76-82.
- [17] Park S, Jung HH, Park YH, et al. ERK/MAPK pathways play critical roles in EGFR ligands-induced MMP1 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(4): 680-686.

(收稿日期: 2013-11-20 修回日期: 2014-01-25)

(上接第 1728 页)

- 手术肺部并发症的预防措施[J]. *亚太传统医药*, 2009, 5(2): 93-94.
- [13] 柳硕岩,王枫,郑庆丰,等. 腔镜食管癌根治术在食管癌治疗中的临床应用[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2012, 15(9): 947-949.

- [14] Gao Y, Wang Y, Chen L, et al. Comparison of open three-field and minimally-invasive esophagectomy for esophageal cancer[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2011, 12(3): 366-369.

(收稿日期: 2013-11-23 修回日期: 2014-01-08)