

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.24.001
文章编号: 1005-8982(2020)24-0001-05

基础研究·论著

MicroRNA-494对胃癌细胞增殖、 细胞周期及凋亡的影响

车宇, 梁静, 杨怡萍, 廖娟, 王蓓, 蔡英全, 邵帅
(陕西省肿瘤医院 放疗科, 陕西 西安 710061)

摘要: **目的** 探讨 microRNA-494 (miR-494) 对胃癌细胞增殖、细胞周期及凋亡的影响。**方法** 选取 2015 年 1 月—2018 年 1 月被陕西省肿瘤医院收治并行手术切除的 60 例患者的胃癌组织及对应癌旁组织 (距肿瘤边缘 >2 cm) 标本。将胃癌细胞 MGC803 分为 miR-494 组和对照组。采用 PCR 检测胃癌组织及体外培养细胞中的 miR-494 表达水平。在 MGC803 细胞中过表达 miR-494, 采用 MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞周期及细胞凋亡。PCR 及 Western blotting 检测 miR-494 潜在靶点 Cyclin D1 的表达变化。**结果** 癌旁组织 miR-494 相对表达量较胃癌组织高 ($P < 0.05$)。不同肿瘤直径、TNM 分期 miR-494 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组 MGC803 细胞 miR-494 相对表达量较 miR-494 组低 ($P < 0.05$)。miR-494 组 OD 值较对照组低 ($P < 0.05$)。对照组 CyclinD1 mRNA 和蛋白相对表达量较 miR-494 组高 ($P < 0.05$)。miR-494 与 CyclinD1 免疫组织化学评分呈负相关 ($r = -0.469, P < 0.05$)。**结论** 胃癌组织中 miR-494 表达水平降低, 过表达 miR-494 能通过下调 Cyclin D1 的表达发挥抑制胃癌细胞增殖和细胞周期进展的作用。

关键词: 胃肿瘤; 细胞增殖; 细胞周期

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

MiR-494 arrests gastric cancer proliferation and cell cycle progression through down-regulating CyclinD1

Yu Che, Jing Liang, Yi-ping Yang, Juan Liao, Qian Wang, Ying-quan Cai, Shuai Shao
(Department of Radiotherapy, Shaanxi Cancer Hospital, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

Abstract: Objective To investigate the role of miR-494 in gastric cancer proliferation, cell cycle progression and apoptosis. **Methods** The gastric cancer and corresponding adjacent tissues (at least 2 cm away from the tumor margins) were surgically removed from 60 patients admitted to our hospital from January 2015 to January 2018. The gastric cancer MGC803 cells were divided into miR-494 group and control group. The expression of miR-494 in gastric cancer tissues and the cultured cells in vitro was detected by PCR. MTT assay and flow cytometry assay were used to detect cell proliferation, cell cycle and apoptosis. PCR and immunoblotting were used to detect CyclinD1 expression. **Results** The miR-494 expression was down-regulated in gastric cancer tissues ($t = 5.421, P < 0.001$) and associated with large tumor size (> 3 cm, $t = 1.844, P = 0.041$) and advanced TNM stage (III + IV, $t = 1.969, P = 0.028$). Up-regulation of miR-494 inhibited proliferation ($t = 3.868, P = 0.022$) and cell cycle progression ($t = 3.721, P = 0.023$), but had no effect on apoptosis ($t = 1.034, P = 0.063$) in MGC803 cells. The expression of CyclinD1 was impaired due to the overexpression of miR-494 in vitro ($P < 0.05$). Moreover, the negative relationship between CyclinD1 IHC scores and miR-494 levels was confirmed in clinical samples ($r = -0.469, P = 0.009$). **Conclusions** The expression of miR-494 was down-regulated in gastric cancer tissues. Up-regulation of miR-494 could inhibit gastric tumor cell proliferation and cell cycle progression through inhibiting CyclinD1.

Keywords: miR-494; gastric cancer; CyclinD1; proliferation; cell cycle

收稿日期: 2020-04-20

[通信作者] 梁静, E-mail: 317380833@qq.com

近年来,我国胃癌的发病率呈逐年上升趋势^[1]。胃癌早期多以烧心、腹胀不适及体重下降等亚临床表现为主,许多患者就诊时其胃癌已属临床晚期,失去了行根治性手术的机会。研究抑制胃癌生长的分子指标对提高胃癌患者手术切除率及改善患者长期预后具有重要作用。

MicroRNA 是单链的长度较短的 RNA,通常其碱基数量为 18 ~ 25 bp^[2]。已发现许多与胃癌细胞增殖、转移及肿瘤血管新生密切相关的 microRNA^[3-4]。microRNA-494 (miR-494) 是近年来新鉴定出的一种 microRNA,在多种妇科肿瘤(包括子宫内膜癌及卵巢癌)中的表达水平显著下调^[5-6]。目前,miR-494 在胃癌中的表达水平及生物学功能尚不可知。笔者拟通过检测 miR-494 在胃癌组织及胃癌细胞 MGC803 中的表达,探究 miR-494 对胃癌细胞增殖、细胞周期及凋亡的影响。

1 材料与方 法

1.1 组织标本

选取 2015 年 1 月—2018 年 1 月被陕西省肿瘤医院收治并行手术切除的 60 例患者的胃癌组织及对应癌旁组织(距肿瘤边缘 >2 cm)标本。其中男性 38 例,女性 22 例;年龄 37 ~ 68 岁,中位年龄 53 岁。

1.2 细胞来源及主要试剂

MGC803 细胞由陕西省肿瘤医院放疗科实验室保存。microRNA mimics 模拟物(miR-494 及阴性对照)、引物(miR-494 及 U6)购自广州复能基因有限公司及广州锐博生物科技有限公司,DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司,Trizol、Lipofectamine® 2000、SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase 及 DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit 购自美国 Invitrogen 公司,细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) 抗体(ab494175)及 β -actin 抗体(ab8226)购自美国 Abcam 公司,MTT 药物、Annexin-V/PI 细胞周期及凋亡检测试剂盒购自上海生物工程股份有限公司。

1.3 PCR

按 Trizol 试剂说明书提取胃癌组织、癌旁组织及 MGC803 细胞 RNA,分别组建 RT-PCR 及 real-time PCR 反应体系。RT-PCR 反应条件:50℃ 逆转录 30 min,94℃ 变性 2 min,共 1 个循环。real-time PCR 反应条件:94℃ 变性 15 s,60℃ 退火 30 s,68℃ 延伸 3 min,共 40 个循环,72℃ 继续延伸 10 min。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$

法计算 miR-494 及 CyclinD1 mRNA 的相对表达量。

1.4 细胞培养及 mimics 转染

培养 MGC803 细胞至稳定传代,将 MGC803 细胞以合适密度接种于 6 孔板中,过夜培养后洗涤细胞。根据 mimics 转染分为 miR-494 组和对照组。miR-494 组每孔加入 100 pmol miR-494 mimics、2 ml 含血清 DMEM 及 5 μ l 转染试剂;对照组每孔加入 100 pmol 阴性对照 mimics、2 ml 含血清 DMEM 及 5 μ l 转染试剂。转染 24 h 后进行后续实验。

1.5 MTT 法

将 MGC803 细胞分别转染 24 h、48 h、72 h 后按 2×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板,每个时间点设置 6 个平行对照。培养过夜后加入 MTT 溶液,再次避光培养 4 h。吸净上清液后每孔用 150 μ l DMSO 溶液溶解 MTT 结晶。读取酶标仪 490 nm 处的光密度(optical density, OD)值。

1.6 流式细胞术

通过流式细胞仪检测过表达 miR-494 对 MGC803 细胞周期及细胞凋亡的影响。将转染 72 h 后的 MGC803 细胞用冷 PBS 洗 2 次,胰酶消化后以 800 r/min 离心 5 min,获取细胞沉淀,用 PBS 缓冲液重悬细胞并调整细胞密度为 5×10^6 个/ml,取 100 μ l 细胞悬液与 10 μ l 碘化丙啶(PI)溶液混合上机检测细胞周期;取 100 μ l 细胞悬液与 5 μ l 及 10 μ l PI 溶液混合上机检测细胞凋亡。

1.7 Western blotting

采用放射免疫沉淀法提取细胞总蛋白,SDS-PAGE 胶电泳分离蛋白,70 V 湿转 120 min 转印目标蛋白至 PVDF 膜上,室温封闭 2 h 后将目标条带分别置入 CyclinD1 和 β -actin 一抗溶液中,在 4℃ 下孵育过夜,用 1 : 5 000 稀释的 HRP 标记二抗,在室温中孵育目标条带 1 h。采用 ECL 法显影,计算蛋白相对表达量。

1.8 免疫组织化学法

将甲醛固定、石蜡包埋的组织切片常规脱蜡、水化及微波抗原修复,分别用 3% 过氧化氢及 10% 山羊血清封闭切片。用 PBS 溶液按 1 : 100 配制 CyclinD1 一抗工作液,覆盖组织切片,4℃ 摇晃、孵育过夜。PBS 溶液洗净未结合一抗后,使用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗结合相应一抗,用 DAB 法显示阳性蛋白。计算染色得分:无阳性染色细胞计 0 分,<25% 计 1 分,25% ~ <50% 计 2 分,50% ~ <75% 计 3 分, $\geq 75%$ 计 4 分^[7]。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验或重复测量设计的方差分析, 相关性分析用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌与癌旁组织 miR-494 相对表达量比较

癌旁组织 miR-494 相对表达量为 (1.327 ± 0.052), 胃癌组织为 (0.921 ± 0.048), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.421, P=0.000$), 癌旁组织较胃癌组织高。不同肿瘤直径、TNM 分期患者的 miR-494 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 不同性别、年龄, 及是否吸烟、幽门螺杆菌感染、淋巴结转移患者的 miR-494 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

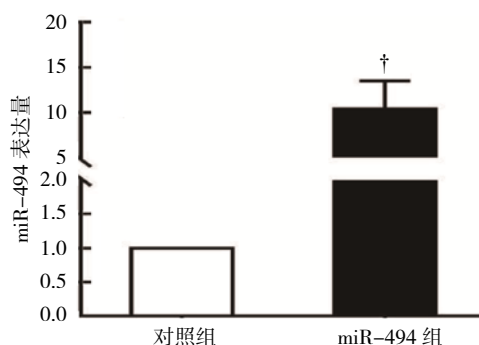
表 1 不同临床病理特征患者的 miR-494 相对表达量比较 ($n=60, \bar{x} \pm s$)

| 临床病理特征 | miR-494 | t 值 | P 值 |
|----------------|-------------------|-------|-------|
| 性别 | | | |
| 男 | 0.871 ± 0.037 | 1.295 | 0.062 |
| 女 | 0.931 ± 0.065 | | |
| 年龄 | | | |
| ≤ 60 岁 | 0.935 ± 0.026 | 1.167 | 0.087 |
| >60 岁 | 0.881 ± 0.038 | | |
| 吸烟 | | | |
| 是 | 0.904 ± 0.049 | 0.856 | 0.105 |
| 否 | 0.936 ± 0.028 | | |
| 幽门螺杆菌感染 | | | |
| 是 | 0.933 ± 0.019 | 0.738 | 0.211 |
| 否 | 0.909 ± 0.024 | | |
| 肿瘤直径 | | | |
| ≤ 3 cm | 0.975 ± 0.031 | 1.844 | 0.041 |
| >3 cm | 0.722 ± 0.046 | | |
| 淋巴结转移 | | | |
| 是 | 0.884 ± 0.055 | 1.660 | 0.059 |
| 否 | 0.939 ± 0.032 | | |
| TNM 分期 | | | |
| I、II 期 | 0.949 ± 0.027 | 1.969 | 0.028 |
| III、IV 期 | 0.836 ± 0.059 | | |

2.2 miR-494 对 MGC803 细胞增殖、细胞周期进展及凋亡的影响

对照组 MGC803 细胞 miR-494 相对表达量为 (1.00 ± 0.00), miR-494 组为 (11.23 ± 3.87), 经 t 检

验, 差异有统计学意义 ($t=8.031, P=0.000$), 对照组较 miR-494 组低 (见图 1), 表明慢病毒感染促进 MGC803 细胞 miR-494 的表达。两组转染后 24 h、48 h、72 h 的 OD 值比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果如下: ①不同时间点的 OD 值比较, 差异有统计学意义 ($F=15.762, P=0.016$); ②两组的 OD 值比较, 差异有统计学意义 ($F=67.896, P=0.008$), miR-494 组较对照组低, 细胞活力较低; ③两组的 OD 值变化趋势比较, 差异有统计学意义 ($F=19.214, P=0.013$) (见表 2 和图 2)。流式细胞术结果表明, 对照组 G_0/G_1 期比例为 (40.33 ± 4.23)%, miR-494 组为 (78.19 ± 6.48)%, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=3.721, P=0.023$) (见图 3); 对照组细胞凋亡比例为 (11.28 ± 3.05)%, miR-494 组为 (13.45 ± 2.16)%, 经 t 检验, 差异无统计学意义 ($t=1.034, P=0.063$) (见图 4)。



† 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 两组 miR-494 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

表 2 两组不同时间点 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 24 h | 48 h | 72 h |
|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 对照组 | 0.176 ± 0.011 | 0.463 ± 0.031 | 0.814 ± 0.032 |
| miR-494 组 | 0.131 ± 0.009 | 0.296 ± 0.017 | 0.544 ± 0.034 |

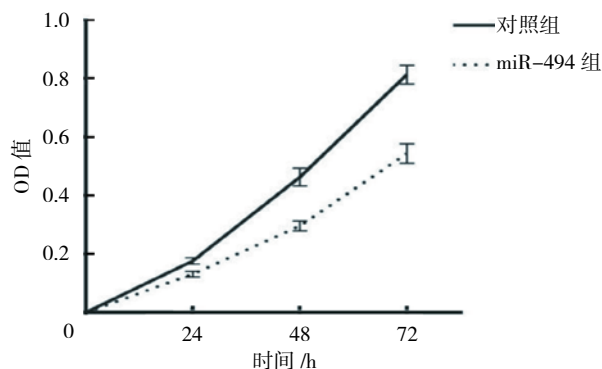
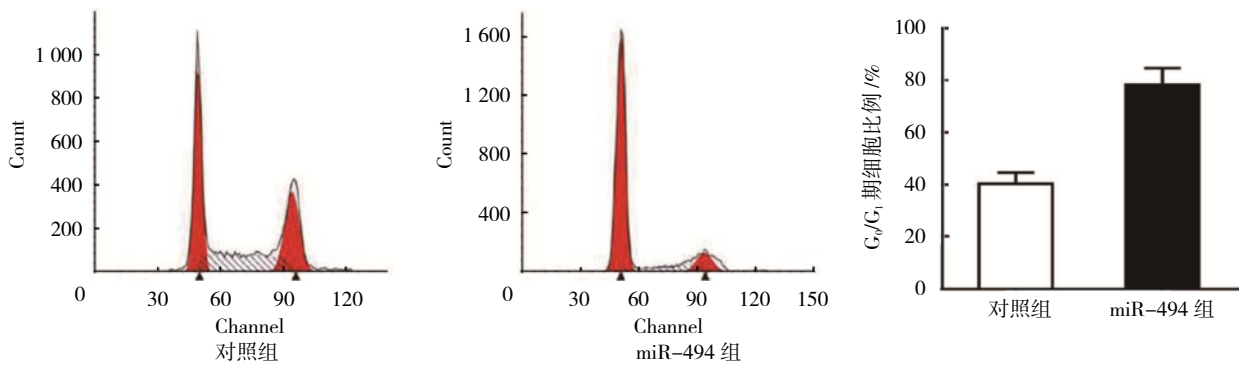


图 2 两组不同时间点 OD 值变化趋势 ($\bar{x} \pm s$)



† 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 两组 G_0/G_1 期细胞的流式细胞图

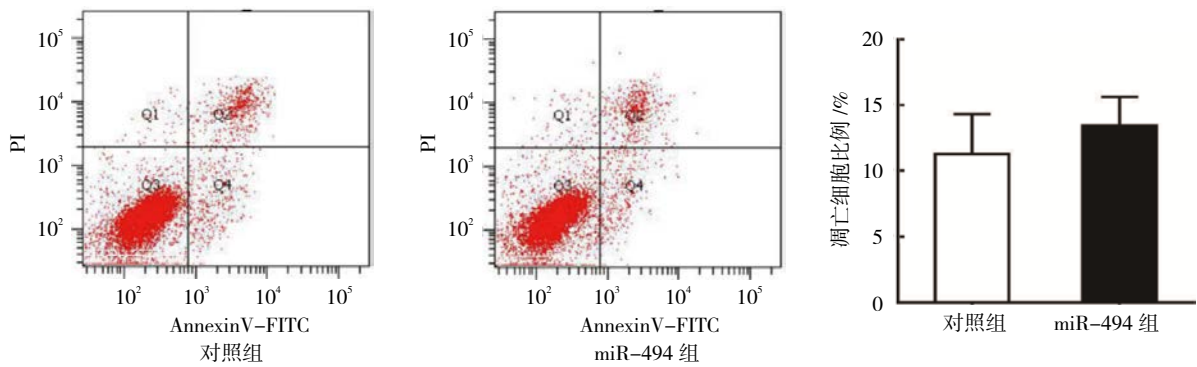
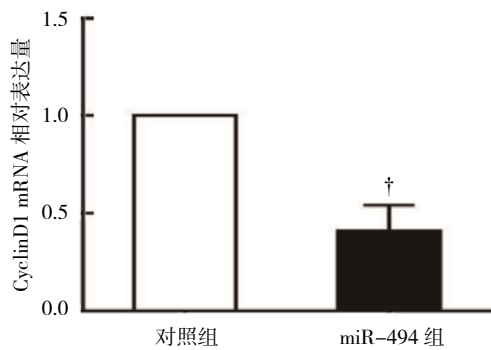


图 4 两组凋亡细胞的流式细胞图

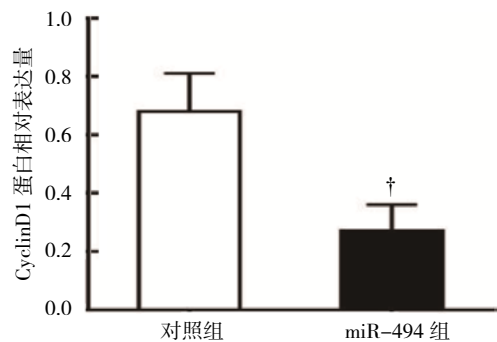
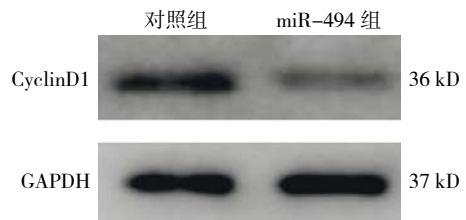
2.3 miR-494 对 MGC803 细胞中 CyclinD1 表达的影响

对照组 CyclinD1 mRNA 相对表达量为 (1.00 ± 0.00) , miR-494 组为 (0.41 ± 0.13) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=4.031, P=0.011$), 对照组较 miR-494 组高 (见图 5), 表明过表达 miR-494 抑制 CyclinD1 mRNA 的表达。对照组 CyclinD1 蛋白相对表达量为 (0.68 ± 0.13) , miR-494 组为 (0.27 ± 0.09) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=2.106, P=0.042$), 对照组较 miR-494 组高 (见图 6), 表明过表达 miR-494 下调 CyclinD1 蛋白的表达。



† 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 两组 CyclinD1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)



† 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 6 两组 CyclinD1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.4 miR-494 与 CyclinD1 的相关性

miR-494 与 CyclinD1 免疫组织化学评分呈负相关 ($r=-0.469, P=0.009$)。见图 7。

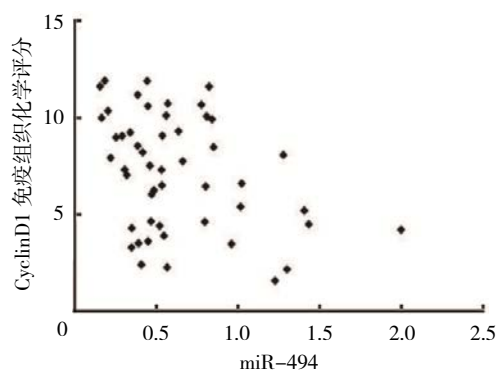


图 7 miR-494 与 CyclinD1 免疫组织化学评分的相关性散点图

3 讨论

miR-494 首先被发现于人类视网膜母细胞瘤中, 其在人类许多良恶性疾病中扮演重要角色。例如, 抑制动脉粥样硬化小鼠体内 miR-494 的表达水平能够提高斑块的稳定性^[8]; 高血清 miR-494 水平与子宫内膜异位症患者并发不孕关系密切^[9]; 低表达 miR-494 的乳腺癌患者预后不良^[10]。但其在胃癌的表达及生物学功能尚未完全清楚。

本研究结果提示 miR-494 在胃癌中扮演潜在抑癌角色, miR-494 能够显著抑制体外培养 MGC803 细胞的增殖, 阻碍细胞周期的进展。但是其对细胞凋亡的发生并无显著影响。除此之外, 笔者通过文献查询也发现, miR-494 对结直肠癌转移及肺癌耐药也具有调控作用^[11-12], 说明 miR-494 具有多样性的抗肿瘤作用, 值得进一步深入研究。

MicroRNA 能够通过结合靶基因 3' -UTR 区而发挥负向调控作用。结合上述功能学实验结果及生物信息学分析结果发现, 细胞周期蛋白 CyclinD1 mRNA 存在于 miR-494 的结合位点, 可能是 miR-494 的潜在靶点之一。进一步实验发现, 过表达 miR-494 能下调 CyclinD1 的表达, 且在组织水平上, miR-494 与 CyclinD1 的表达呈负相关。CyclinD1 是调控细胞增殖和细胞周期的主要生物因子^[13]。有研究指出, CyclinD1 的异常高表达与胃癌的进展密切相关^[13]。因此, 下调 CyclinD1 的表达可能是 miR-494 抑制胃癌细

胞的关键机制之一。

参考文献:

- [1] 黄莎, 戴璠, 高娟娟, 等. 胃癌分子流行病学研究进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2019, 46(1): 16-21.
- [2] 张弛, 张雷. 微 RNA 在胃癌中的相关机制及诊断治疗的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25(1): 55-59.
- [3] 范一博, 车晓芳, 赵欢, 等. MicroRNA-1183 通过抑制 CBL-B 的表达促进胃癌细胞的增殖及转移 [J]. 中国医科大学学报, 2018, 47(3): 202-205.
- [4] 徐勇超, 唐礼恭, 李星, 等. 微小 RNA-1 对胃癌细胞中血管生成相关因子表达的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(10): 1871-1873.
- [5] ZHU L C, WANG X Y, WANG T, et al. miR-494-3p promotes the progression of endometrial cancer by regulating the PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(1): 581-588.
- [6] ZHAO X J, ZHOU Y, CHEN Y, et al. miR-494 inhibits ovarian cancer cell proliferation and promotes apoptosis by targeting FGFR2[J]. Oncol Lett, 2016, 11(6): 4245-4251.
- [7] 李超, 刘志奎, 窦常伟, 等. KMT5A 对肝细胞癌迁移侵袭的影响及分子机制研究 [J]. 实用医学杂志, 2017, 33(16): 2634-2638.
- [8] COSTANTINO S, AKHMEDOV A, MELINA G, et al. Obesity-induced activation of JunD promotes myocardial lipid accumulation and metabolic cardiomyopathy[J]. Eur Heart J, 2019, 40(12): 997-1008.
- [9] 赵喜艳, 崔美英, 范丽丝, 等. 子宫内膜异位症血清 miR-494-5p/miR-1304-3p 水平及不孕 [J]. 中国计划生育学杂志, 2019, 27(4): 487-489.
- [10] 靳雪芹, 刘水逸, 李晓怡, 等. miR-494 在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. 临床检验杂志, 2017, 35(11): 828-831.
- [11] ZHANG Y, GUO L, LI Y H, et al. MicroRNA-494 promotes cancer progression and targets adenomatous polyposis coli in colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 1.
- [12] ZHANG Q, LI Y, ZHAO M, et al. miR-494 acts as a tumor promoter by targeting CASP2 in non-small cell lung cancer[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 3008.
- [13] CHOU N H, LO Y H, WANG K C, et al. miR-193a-5p and-3p play a distinct role in gastric cancer: miR-193a-3p suppresses gastric cancer cell growth by targeting ETS1 and CCND1[J]. Anticancer Res, 2018, 38(6): 3309-3318.

(李科 编辑)

本文引用格式: 车宇, 梁静, 杨怡萍, 等. MicroRNA-494 对胃癌细胞增殖、细胞周期及凋亡的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(24): 1-5.