

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.012

文章编号: 1005-8982(2016)15-0065-04

论著

胃癌中 microRNA-218 调控 *BMI1* 基因表达的作用及机制*

范中平¹, 胡悦东², 黄宝俊³

(1. 本溪钢铁公司总医院 普外科, 辽宁 本溪 117000; 2. 中国医科大学附属第一医院 眼科, 辽宁 沈阳 110001; 3. 中国医科大学附属第一医院 肿瘤外科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 探讨胃癌中 microRNA-218(miR-218)调控 *BMI1* 基因表达的作用及机制。**方法** 应用实时定量聚合酶链反应(real-time PCR)检测胃癌及癌旁组织中 miR-218 及 *BMI1* 基因的表达。将 miR-218 的前体(miR-218 precursor) 转染胃癌 BGC823 细胞, Western blot 检测 *BMI1* 蛋白的表达。应用荧光素酶实验分析 miR-218 是否与 *BMI1* 基因 3'非翻译区(3'-UTR)结合。**结果** RT-PCR 结果显示, 相对癌旁组织, 胃癌组织中 miR-218 的表达下调显著, 而 *BMI1* 在胃癌组织中的表达则呈现明显的上调, miR-218 与 *BMI1* 在胃癌及癌旁组织中的表达均为明显的负相关。在转染 miR-218 precursor 的胃癌 BGC823 细胞中, *BMI1* 的蛋白表达显著下调。荧光素酶实验结果证实 miR-218 能够特异性地结合 *BMI1* 基因的 3'-UTR, 并与其表达呈负相关。**结论** miR-218 与 *BMI1* 基因的表达异常与胃癌的发生相关, *BMI1* 基因是 miR-218 的靶基因, miR-218 在胃癌细胞中能够靶向沉默 *BMI1* 基因。

关键词: 胃癌; microRNA-218; *BMI1*; BGC823 细胞

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Effect and mechanism of microRNA-218 in regulation of *BMI1* gene in gastric cancer*

Zhong-ping Fan¹, Yue-dong Hu², Bao-jun Huang³

(1. Department of General Surgery, the General Hospital of Benxi Iron & Steel Co., Benxi, Liaoning 117000, China; 2. Department of Ophthalmology, 3. Department of Oncosurgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of microRNA-218 (miR-218) in regulation of *BMI1* gene in gastric cancer. **Methods** Quantitative real-time PCR was used to detect the expression of miR-218 and *BMI1* mRNA in gastric cancer and adjacent tissues. Western blot was used to investigate *BMI1* protein level and luciferase assay was used to verify the ability of miR-218 binding to *BMI1* after miR-218 precursor transfected into gastric cancer BGC823 cells. **Results** Quantitative real-time PCR results showed that miR-218 was down-regulated and *BMI1* was up-regulated in gastric cancer tissues compared to the adjacent tissues; in both tissues miR-218 and *BMI1* expressions were negatively correlated. Western blot and luciferase assay revealed that miR-218 could negatively regulate *BMI1* protein expression by binding to the 3'-UTR of *BMI1* gene. **Conclusions** The abnormal expressions of miR-218 and *BMI1* are involved in gastric carcinogenesis; and miR-218 could target and silence *BMI1* gene expression in gastric cells.

Keywords: gastric cancer; miR-218; *BMI1*; BGC823 cell

收稿日期: 2015-12-23

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81272716)

[通信作者] 黄宝俊, E-mail: huangbaojun2014@163.com

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,发病率居各类肿瘤之首^[1]。胃癌的治疗方法是以手术为主,结合放化疗的综合治疗,但部分中晚期患者的预后不良,治疗效果欠佳,因此深入探究胃癌发生、发展的分子机制,寻找效果更佳、特异性更好的治疗靶点和方法是胃癌相关研究的重点。MicroRNA(miR)是一类在多种生物中广泛存在的小分子非编码 RNA,能够与靶基因的 3'非翻译区(3'-UTR)特异性地互补结合,通过抑制靶基因 mRNA 的翻译或者将 mRNA 剪切降解,发挥沉默靶基因表达的作用^[2]。miR 通过抑制靶基因的表达和功能,参与调节增殖分化、凋亡和侵袭转移等多种细胞生物学行为,并在多种复杂疾病及肿瘤的发生、发展中发挥重要作用^[3-4]。本研究通过分子生物学方法探究 miR-218 在胃癌细胞中调控 *BMI1* 基因表达的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 2010 年 9 月 -2013 年 4 月在本溪钢铁公司总医院普外科及中国医科大学附属第一医院肿瘤外科诊断为胃癌的住院患者 38 例,男性 26 例,女性 12 例;年龄 46~61 岁,中位年龄 56.2 岁。取患者组织标本,包括肿瘤组织及距肿瘤边缘 >5 cm 的癌旁组织。人胃癌 BGC823 细胞系由中国医科大学附属第一医院肿瘤外科提供。

1.2 试剂

miR 的提取及检测相关试剂、miR-218 前体(miR-218 precursor)及 miR 对照购自 Ambion 公司,*BMI1* 基因 3'-UTR 的野生型荧光素酶载体 pGL3-Wt.UTR (Wt) 和突变型荧光素酶载体 pGL3-Mut.UTR (Mut, 于 3'-UTR 第 1470~1477 碱基序列引入突变)由上海吉玛公司构建,荧光素酶活性检测试剂盒购自 Invitrogen 公司,Western blot 检测相关试剂购自上海碧云天公司,转染试剂 Trans-messenger 购自 Qiagen 公司,*BMI1* 小鼠抗人单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实时定量聚合酶链反应 提取待测组织标本中的小非编码 RNA,对其进行 3'端加 Poly A 处理,然后进行逆转录。以管家基因 *U6* 为内参基因,按照实时定量聚合酶链反应(real-time PCR)检测试剂盒说明书进行操作,扩增 miR-218。所得实验数据应用比较 Ct 值法,即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行结果分析。

1.3.2 细胞转染 转染前 24 h,在 6 孔板中每孔接种 5×10^4 个 BGC823 细胞,继续培养。取试剂盒中的 Enhancer R 试剂,将 30 pmol 待转染的 miR 与其混合,加入 Trans Messenger 试剂 4 μ l 混匀,再加入无血清培养基至 1 000 μ l 混匀。弃去 BGC823 细胞的培养基,将上述混合液加入培养孔内,孵育 2 h,然后转为正常培养基培养。

1.3.3 Western blot 检测 收获待测细胞,提取蛋白,定量。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后,转印至 PVDF 膜,再经封闭液封闭、抗体杂交孵育和发光成像等操作后得到包含 *BMI1* 蛋白条带,应用凝胶成像分析系统对条带进行定量分析。

1.3.4 荧光素酶实验 分别将 miR-218 precursor 或 miR 对照与野生型或突变型重组载体共转染至胃癌 BGC823 细胞中。其中 A 组 BGC823 细胞共转染 miR-218 precursor 和野生型重组载体,B 组 BGC823 细胞共转染 miR 对照和野生型重组载体,C 组 BGC823 细胞共转染 miR-218 precursor 和突变型重组载体,D 组 BGC823 细胞共转染 miR 对照和突变型重组载体。转染后的 BGC823 细胞,按照双荧光素酶试剂盒说明书检测荧光素酶相对活性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,检验数据的正态性以确定其分布情况,多组比较用单因素方差分析,两组比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中 miR-218 的表达

应用比较 Ct 值法对 RT-PCR 的结果进行相对定量分析,结果显示,miR-218 在胃癌组织中的 ΔCt 值为 (4.72 ± 0.13) ,而在癌旁组织中的 ΔCt 值为 (3.54 ± 0.15) , $\Delta\Delta Ct$ 值为 1.18。胃癌组织中 miR-218 的表达量是癌旁组织的 44.29%,胃癌组织中 miR-218 表达降低($P < 0.01$)。

2.2 胃癌组织中 *BMI1* 的表达及其与 miR-218 表达的相关性

相对定量分析结果显示,*BMI1* 在胃癌组织中的 ΔCt 值为 (2.96 ± 0.15) ,而在癌旁组织中的 ΔCt 值为 (3.8 ± 0.16) , $\Delta\Delta Ct$ 值为 -0.91。胃癌组织中 *BMI1* 的表达量为癌旁组织的 188.03%,胃癌组织中 *BMI1* 的表达增强($P < 0.01$)。Pearson 相关性分析显示,*BMI1* 和 miR-218 在胃癌及其癌旁组织中的表达均表现

出明显的负相关,相关系数为 -0.793。

2.3 miR-218 precursor 转染 BGC823 细胞后对 BMI1 蛋白表达的影响

各组 Western blot 结果见图 1。未转染的 BGC823 细胞和转染 miR 对照的 BGC823 细胞间, BMI1 蛋白的相对表达量差异无统计学意义;而两组 BGC823 细胞比较, 转染 miR-218 precursor 的 BGC823 细胞中的 BMI1 蛋白下调($P<0.01$)。

2.4 荧光素酶实验

在荧光素酶实验中,miR-218 precursor 或 miR 对照与野生型或突变型重组载体被按照不同的组合形式共转染至胃癌 BGC823 细胞中。检测被转染细胞的相对荧光值, 结果显示, 与转染 miR 对照组 BGC823 细胞比较,共转染 miR-218 precursor 和野生型重组载体的 BGC823 细胞的相对荧光值下降,提示 miR-218 能够与 BMI1 基因 3'-UTR 结合, 并抑制

荧光素酶的表达。而共转染 miR-218 precursor 和突变型重组载体的 BGC823 细胞的相对荧光值无明显改变, 说明结合位点序列的改变使其失去与 miR-218 结合的能力。见图 2。

3 讨论

多梳基因家族 (polycomb group genes, PcG) 是一组与细胞周期和增殖相关的重要基因,包括一系列转录抑制子,与多种恶性肿瘤的发生、发展相关^[5-6]。1991 年发现的细胞特异莫洛尼白血病病毒插入位点 1 (BMI1) 基因亦归属于 PcG 基因家族^[7],其在结直肠癌和胃癌中的表达显著下调,而且其表达异常与肿瘤的发生、发展、侵袭转移以及预后等多项临床病理指标相关^[8-10]。本研究首先对 38 例胃癌组织进行 BMI1 基因表达检测,结果显示,与癌旁组织相比,胃癌组织中 BMI1 基因的 mRNA 表达增强。本实验结果与上述报道相符, BMI1 基因在胃癌组织中确实存在明显的表达异常, BMI1 基因可能作为癌基因在胃癌的发生中发挥重要作用。但是胃癌中 BMI1 基因表达下调的原因及机制尚不清楚。

为分析胃癌中 BMI1 基因表达下调的原因,明确 miRNAs 是否在其中发挥作用,本研究采用多种生物信息学软件进行分析预测,分析结果显示, BMI1 基因 mRNA 的 3'-UTR 上存在 miR-218 的结合位点,位于 3'-UTR 第 1470~1477 碱基序列。为验证上述预测结果,明确 miR-218 能够作为上游调控基因参与调节 BMI1 的表达和功能, 本研究将 miR-218 precursor 转染胃癌 BGC823 细胞以提高 miR-218 的表达水平。后续的 Western blot 检测发现, 转染 miR-218 precursor 的 BGC823 细胞中, BMI1 蛋白的表达下调,这提示 miR-218 能够参与调节 BMI1 基因的表达, BMI1 基因可能是 miR-218 的靶基因。本研究发现, miR-218 在胃癌组织的表达下调,而且在胃癌组织及对应的癌旁组织中 BMI1 mRNA 与 miR-218 的表达水平均表现出显著的负相关。上述实验结果进一步明确笔者对于 miR-218 能够作为上游调控基因参与调节 BMI1 表达的推测, 但调控机制如何, miR-218 是否通过与 BMI1 基因 mRNA 的 3'-UTR 结合抑制其翻译,从而下调 BMI1 基因的表达尚不清楚。荧光素酶实验分析结果显示, miR-218 能够与 BMI1 基因 3'-UTR 的野生型载体结合,抑制荧光素酶的表达,而突变型载体则不能引起荧光素酶的表达下降,说明结合序列的改变使

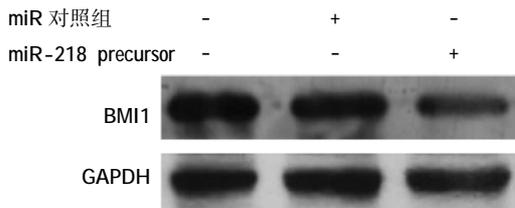
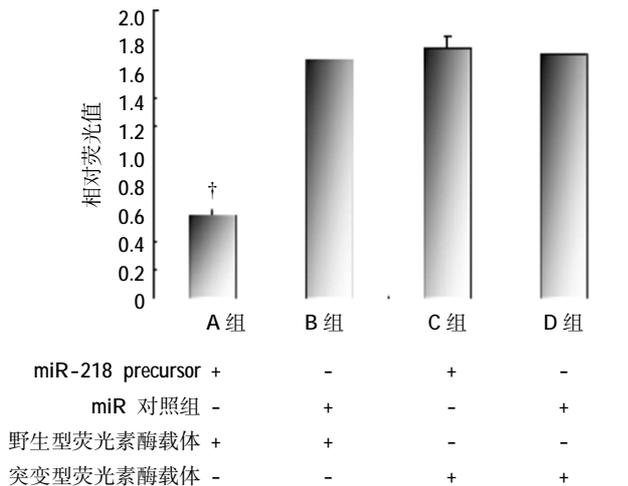


图 1 miR-218 precursor 对 BGC823 细胞中 BMI1 蛋白表达的影响



A 组: BGC823 细胞共转染 miR-218 precursor 和野生型重组载体; B 组: BGC823 细胞共转染 miR 对照和野生型重组载体; C 组: BGC823 细胞共转染 miR-218 precursor 和突变型重组载体; D 组: BGC823 细胞共转染 miR 对照组和突变型重组载体

† 与 B、C、D 组比较, $P<0.01$

图 2 荧光素酶实验报告的基因表达验证 miR-218 对 BMI1 基因的调控

其失去与 miR-218 结合的能力,也证实 miR-218 确实是与 *BMI1* 基因 3'-UTR 第 1470 ~ 1477 碱基序列特异性结合的。

综上所述,*BMI1* 基因是 miR-218 的靶基因之一,miR-218 能够沉默 *BMI1* 基因的表达。miR-218 在胃癌中表达下调,失去沉默 *BMI1* 基因表达的作用,使 *BMI1* 基因在胃癌中表达上调,*BMI1* 基因作为胃癌的一个癌基因存在。

参 考 文 献:

- [1] 赵久达,李豪,曹成珠,等. 1962 例胃癌流行病学分析[J]. 现代预防医学, 2008, 35(3): 439-440.
- [2] CIPOLLINI M, LANDI S, GEMIGNANI F. Micro RNA binding site polymorphisms as biomarkers in cancer management and research[J]. Pharmgenomics Pers Med, 2014, 23(7): 173-191.
- [3] OOM A L, HUMPHRIES B A, YANG C. MicroRNAs: novel players in cancer diagnosis and therapies [J]. Biomed Res Int, 2014(2014): 959461. doi: 10.1155/2014/959461.
- [4] HAYES J, PERUZZI P P, LAWLER S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy[J]. Trends Mol Med, 2014, 20(8): 460-469.
- [5] ALOIA L, STEFANO B D, CROCE L D. Polycomb complexes in stem cells and embryonic development [J]. Development, 2013, 140(12): 2525-2534.
- [6] CREA F, PAOLICCHI E, MARQUEZ V E, et al. Polycomb genes and cancer: time for clinical application[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2012, 83(2): 184-193.
- [7] LOHUIZEN M V, VERBEEK S, SCHEIJEN B, et al. Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging[J]. Cell, 1991, 65(5): 737-752.
- [8] LU H, SUN H Z, LI H, et al. The clinicopathological significance of Bmi-1 expression in pathogenesis and progression of gastric carcinomas[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(7): 3437-3441.
- [9] PUN J C S, CHAN J Y J, CHUN B K M, et al. Plasma Bmi1 mRNA as a potential prognostic biomarker for distant metastasis in colorectal cancer patients[J]. Mol Clin Oncol, 2014, 2(5): 817-820.
- [10] RAJABPOUR F V, RAOOFIAN R, YOUSSEFIAN L, et al. BMI1 and TWIST1 downregulated mRNA expression in basal cell carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(8): 3797-3800.

(申海菊 编辑)