

网络出版时间: 2020-12-2 17:08 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20201201.1526.010.html>

miR-381 靶向 TMEM16A 对胃癌细胞增殖和侵袭的影响

柯超¹, 蒋斌¹, 周红见¹, 李全富²

摘要 目的 探究 miR-381 靶向调控跨膜蛋白 16A (TMEM16A) 对胃癌细胞增殖和侵袭的影响及其机制。方法

选取行手术切除的胃癌患者 34 例, 采集其癌组织及癌旁正常组织(距癌组织 < 3 cm); 正常培养胃癌细胞 AGS、MKN45、SGC7901 和正常人胃黏膜细胞 GES-1, qRT-PCR 检测组织和细胞中 miR-381 的表达; 将 miR-381-mimics、TMEM16A-siRNA 转染 AGS 细胞, 另设置空白对照组, 检测细胞中 miR-381 和 TMEM16A mRNA 的表达; 应用在线生物信息学预测软件和双荧光素酶实验分析 miR-381 和 TMEM16A 的靶向关系; MTT 法检测细胞增殖情况, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况, Transwell 小室检测细胞侵袭能力; Western blot 检测细胞中 p27 基因、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase-3、caspase-9)、E 钙黏素、波形蛋白、基质金属蛋白酶(MMP-2、MMP-9)的表达。结果 与正常组织和正常胃黏膜细胞相比, 胃癌组织和细胞中 miR-381 表达降低($P < 0.05$), 而 TMEM16A mRNA 表达升高($P < 0.05$); 与空白对照组相比, miR-381-mimics 组 miR-381 表达上升, TMEM16A mRNA 表达下降($P < 0.05$), TMEM16A-siRNA 组 TMEM16A mRNA 表达下降($P < 0.05$), 联合转染组 miR-381 表达上升($P < 0.05$), 但与 miR-381-mimics 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), TMEM16A mRNA 表达下降($P < 0.05$), 且低于 miR-381-mimics 组、TMEM16A-siRNA 组($P < 0.05$); 与空白对照组相比, miR-381-mimics 组、TMEM16A-siRNA 组及联合组细胞增殖明显抑制, 细胞凋亡率、p27、caspase-3、caspase-9、E-cadherin 的表达增加, 细胞侵袭数、Vimentin、MMP-2 及 MMP-9 的表达下降($P < 0.05$)。结论 miR-381 可负向调控 TMEM16A 抑制胃癌细胞 AGS 的增殖和侵袭, 并促进其凋亡。

关键词 miR-381; 调控跨膜蛋白 16A; 胃癌; 增殖; 侵袭

中图分类号 R 363.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)12-1866-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.12.010

胃癌在全球范围内均有较高的致死率, 胃癌细

胞的无限增殖和局部、远处转移是预后不佳的主要原因^[1], 然而, 胃癌增殖侵袭机制的研究尚无突破性进展。大量证据^[2-3]表明, miRNA 在多种癌症中存在表达异常, 可能参与细胞增殖、凋亡、侵袭和转移等过程。因此, 识别肿瘤特异性 miRNA, 将有利于肿瘤的诊断、治疗及预后。据报道^[4], miR-381 在胃癌中低表达, 可调控 LRH-1、Twist1 表达抑制胃癌细胞的增殖和侵袭。调控跨膜蛋白 16A (transmembrane protein 16A, TMEM16A) 属于钙离子激活的氯离子通道蛋白, 参与细胞信号转导、平滑肌收缩等^[5]。研究^[6]发现, miR-381 可靶向 TMEM16A 抑制胃癌细胞上皮间质转化。该研究旨在明确 miR-381 和 TMEM16A 的靶向关系, 观察 miR-381 是否通过 TMEM16A 影响胃癌细胞 AGS 生物学行为, 为胃癌的治疗提供有效分子靶点。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 组织 选取 2018 年 3 月—2019 年 3 月行手术切除的胃癌患者 34 例, 采集其癌组织及癌旁正常组织(距癌组织 < 3 cm), 组织样本保存于液氮罐中; 患者经术后病理检测确诊为胃癌, 知情且同意本次采集, 本研究经武汉市第三医院伦理委员会批准。

1.1.2 细胞株 胃癌细胞 AGS、MKN45、SGC7901 和正常人胃黏膜细胞 GES-1 购自上海生物细胞研究所, 胃癌细胞的生物学特性见表 1。

表 1 胃癌细胞 AGS、MKN45、SGC7901 的生物学特性

细胞株	建系细胞	分化程度	致瘤性	生长方式
AGS	胃腺癌	不明	不致瘤	贴壁
MKN45	胃腺癌	低分化	高致瘤	贴壁
SGC7901	淋巴结转移癌	中分化	高致瘤	贴壁

1.2 主要试剂与仪器 胎牛血清、RPMI1640 培养基、DMSO(美国 Gibco 公司), 引物序列由江苏百奥迈科生物技术有限公司合成, 脂质体 3000 试剂盒(美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒(美国 Gene-Copoeia 公司), 荧光素酶报告系统(美国 Promega 公司), MTT 粉末(上海广锐生物科技有限公司),

2020-07-10 接收

基金项目: 湖北省卫生厅青年科技人才项目(编号: QJX2015-32)

作者单位: 武汉市第三医院(武汉大学附属同仁医院)¹ 胃肠、腹壁与疝外科,² 肛肠外科, 武汉 430060

作者简介: 柯超, 男, 硕士研究生;

蒋斌, 男, 主治医师, 责任作者, E-mail: shiyouyou2v@163.com

FITC-Annexin V/PI 试剂盒(德国 Miltenyi 公司), Transwell 小室(上海子起生物科技有限公司), 蛋白一抗(美国 Cell Signaling 公司), 细胞培养箱(上海轩仪仪器设备有限公司), qRT-PCR 仪(美国 BioRad 公司), 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基重悬细胞, 置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育; 待细胞融合至 80% ~ 90% 时, 消化传代培养; 取生长状况良好的细胞用于后续实验。

1.3.2 细胞分组与转染 将 AGS 细胞分为空白对照组、miR-381 过表达组(miR-381-mimics)、TMEM16A 干扰组(TMEM16A-siRNA), 采用脂质体 3000 试剂盒, 分别将 miR-381-NC、miR-381-mimics、TMEM16A-siRNA 转染 AGS 细胞, 采用流式细胞仪检测转染效率, 筛选转染效率在 60% 的细胞用于后续实验。

1.3.3 qRT-PCR 检测组织和细胞中 miR-381 和 TMEM16A mRNA 的表达 采用 TRIzol 法提取组织、细胞中的总 RNA, 应用逆转录试剂盒合成 cDNA, 混入荧光染料后进行 qRT-PCR, 采用 2^{-ΔΔCt} 法, 以 U6 为内参定量, 计算 miR-381 的表达; 以 GAPDH 为内参定量, 计算 TMEM16A mRNA 的表达。各基因引物序列^[7-8]见表 2, 作 5 次独立重复实验。

表 2 基因引物序列

基因	序列(5'-3')
U6	正义: CTCGCTTCGGCAGCACA 反义: AACGCTTCACGAATTTGCGT
miR-381	正义: AGTCTATACAAGGGCAAGCTCTC 反义: CACTTCCTCAGCACTTGTGTTAT
GADPH	正义: CTCCTCCTGTTT GACAGTCAGC 反义: CCCAATACGACCAATCCGTT
TMEM16A	正义: ATTTACCAATCTTGTCTCCATCA 反义: TGATAACTCCAAGAAGGATTGCA

1.3.4 双荧光素酶实验 应用生物信息学预测软件 TargetScan3.1 对 miR-381 和 TMEM16A 的靶向关系进行预测; 根据预测结果, 合成含有结合位点 DNA 片段的野生型(wild type, wt) 以及含有结合位点突变体 DNA 片段的突变型(mutant, mut), 构建荧光素酶报告载体; 采用脂质体 3000 试剂盒, 将 TMEM16A 3'-wt、TMEM16A 3'-mut 及 miR-381-mimics 转染 AGS 细胞, 培养 48 h 后检测各组细胞荧光素酶活性。

1.3.5 MTT 法检测细胞增殖 将各组细胞接种至

96 孔板, 分别培养 24、48、72 h, 加入 MTT 溶液, 继续培养 4 h, 弃液后加入 DMSO, 轻微震荡 6 min, 于 570 nm 处检测各孔吸光度(optical density, OD) 值, OD 值越大表明细胞密度越大。

1.3.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集各组细胞, 重悬于孵育缓冲液, 离心后加入 FITC-Annexin V 和 PI 染液混匀, 室温下避光反应 5 min; 孵育缓冲液清洗后, 加入荧光 SA-FLOUS 溶液, 避光条件下 4℃ 孵育 20 min; 应用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。散点图结果: 左下象限(FITC⁻/PI⁻) 显示活细胞, 右上象限(FITC⁺/PI⁺) 为坏死细胞, 右下象限(FITC⁺/PI⁻) 为凋亡细胞。

1.3.7 Transwell 小室法检测细胞侵袭 将基质胶包裹 Transwell 小室, 凝固后接种各组细胞于上室, 并在下室中接入含 20% 的 RPMI1640 培养基; 培养 48 h 后, 吸弃 Transwell 小室上室中培养液, 并拭去膜内侧多余细胞; 取出小室固定于 4% 多聚甲醛中, 反应 20 min; 滴加 DAPI 染色, 于显微镜下观察、计数侵袭细胞数。

1.3.8 Western blot 检测细胞中蛋白的表达 收集各组细胞, 加入裂解液充分提取细胞中总蛋白, 经 BCA 法检测蛋白浓度, 各组取等量蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转膜, 将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h, 分别加入相应蛋白一抗(1:1 000) 于 4℃ 过夜, 再置于 HRP 标记的二抗(1:8 000) 中 37℃ 反应 1 h; 最后滴加 ECL 发光显示蛋白条带, 应用 Image J 软件灰度分析各蛋白条带, 以 β-actin 为内参, 计算含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteiny l aspartate specific proteinase, caspase-3、caspase-9)、E 钙黏素(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、基质金属蛋白酶(matrix metallo-proteinase, MMP-2、MMP-9) 的表达量(目标蛋白表达量 = 目标蛋白灰度值均值/β-actin 灰度值均值)。

1.4 统计学处理 通过双人双盲方式录入数据, 采用 SPSS21.0 软件进行统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析、SNK-q 检验或 t 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组织和细胞中 miR-381 和 TMEM16A mRNA 表达的比较 采用 TRIzol 法提取不同组织和细胞中的总 RNA, 用 qRT-PCR 分析 miR-381 和 TMEM16A mRNA 的相对表达水平, 结果显示, 胃癌组织 miR-381 的相对表达水平为 0.37 ± 0.06, 癌旁

正常组织为 0.82 ± 0.12 ; 与癌旁正常组织相比, 胃癌组织中 miR-381 表达降低 ($t = 19.558, P < 0.001$)。胃癌细胞 AGS、MKN45、SGC7901 和正常细胞 GES-1 中 miR-381 相对表达水平分别为 0.29 ± 0.05 、 0.47 ± 0.09 、 0.82 ± 0.07 和 1.00 ± 0.11 , 差异有统计学意义 ($F = 75.676, P < 0.001$); 与人正常胃黏膜细胞 GES-1 相比, 胃癌细胞 AGS、MKN45、SGC7901 中 miR-381 表达均下降 ($q_{\text{AGS}} = 19.113, P < 0.001$; $q_{\text{MKN45}} = 14.267, P < 0.001$; $q_{\text{SGC7901}} = 4.845, P = 0.004$)。

胃癌组织 TMEM16A mRNA 的相对表达水平为 0.98 ± 0.12 , 癌旁正常组织为 0.30 ± 0.07 ; 与癌旁正常组织相比, 胃癌组织中 TMEM16A mRNA 表达升高 ($t = 28.541, P < 0.001$)。胃癌细胞 AGS、MKN45、SGC7901 和正常细胞 GES-1 中 TMEM16A mRNA 相对表达水平分别为 1.65 ± 0.15 、 1.32 ± 0.10 、 1.19 ± 0.14 和 1.00 ± 0.12 , 差异有统计学意义 ($F = 22.516, P < 0.001$); 与人正常胃黏膜细胞 GES-1 相比, 胃癌细胞 AGS、MKN45、SGC7901 中 TMEM16A mRNA 表达均升高 ($q_{\text{AGS}} = 11.272, P < 0.001$; $q_{\text{MKN45}} = 5.550, P = 0.003$; $q_{\text{SGC7901}} = 3.295, P = 0.033$)。

2.2 过表达 miR-381 对 AGS 细胞中 miR-381 和 TMEM16A mRNA 表达的影响 将 miR-381-mimics、TMEM16A-siRNA 转染 AGS 细胞, 经流式细胞仪测得转染效率分别为 62.37% 和 65.38%, 可用于后续实验; 采用 TRIzol 法提取各组细胞中的总 RNA, 用 qRT-PCR 分析 miR-381 和 TMEM16A mRNA 的相对表达水平, 结果如表 3 所示, 与空白对照组相比, miR-381-mimics 组细胞中 miR-381 的表达上升 ($q = 94.524, P < 0.001$), TMEM16A mRNA 表达下降 ($q = 16.045, P < 0.001$); TMEM16A-siRNA 组 TMEM16A mRNA 表达下降 ($q = 26.407, P < 0.05$), 但 miR-381 的表达无变化 ($q = 0.247, P = 0.864$); 联合转染组 miR-381 的表达上升 ($q = 92.300, P < 0.001$), 但与 miR-381-mimics 组比较无差异 ($q = 2.224, P = 0.136$), TMEM16A mRNA 表达下降 ($q = 29.415, P < 0.001$), 且明显低于 miR-381-mimics 组、TMEM16A-siRNA 组 ($q_{\text{miR-381-mimics}} = 13.371, P < 0.001$; $q_{\text{TMEM16A-siRNA}} = 3.008, P = 0.049$), 详见表 3。miR-381-mimics 对 TMEM16A mRNA 的沉默效率为 $(46.6 \pm 1.8)\%$, TMEM16A-siRNA 对 TMEM16A mRNA 的沉默效率为 $(76.3 \pm 2.4)\%$, miR-381-mim-

ics 联合 TMEM16A-siRNA 对 TMEM16A mRNA 的沉默效率为 $(85.4 \pm 2.1)\%$ 。

表 3 各组细胞中 miR-381 和 TMEM16A mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	miR-381	TMEM16A mRNA
空白对照	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09
miR-381-mimics	8.65 ± 0.21	0.52 ± 0.08
TMEM16A-siRNA	1.02 ± 0.12	0.21 ± 0.05
联合	8.47 ± 0.25	0.12 ± 0.03
F 值	2 901.725	176.266
P 值	< 0.001	< 0.001

2.3 miR-381 和 TMEM16A 靶向关系 应用 TargetScan3.1 软件预测 miR-381 和 TMEM16A 的靶向关系, 可能的结合位点如图 1 所示; 根据预测结果, 构建荧光素酶报告载体验证靶向关系。双荧光素酶实验结果显示, TMEM16A 3'-wt 对照组细胞中荧光素酶活性为 1.00 ± 0.11 , 而共转染 TMEM16A 3'-wt 和 miR-381-mimics 组为 0.37 ± 0.07 , 其荧光素酶活性低于 TMEM16A 3'-mut 对照组 ($t = 10.804, P < 0.001$); TMEM16A 3'-mut 对照组细胞中荧光素酶活性为 0.98 ± 0.08 , 共转染 TMEM16A 3'-mut 和 miR-381-mimics 组为 1.03 ± 0.10 , 与 TMEM16A 3'-mut 对照组比较无差异 ($t = 0.329, P = 0.751$; $t = 0.451, P = 0.664$), 证实 miR-381 和 TMEM16A 的靶向关系。

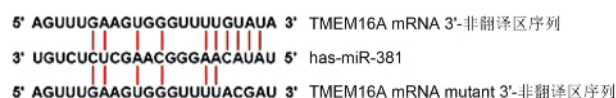


图 1 miR-381 和 TMEM16A 预测结合位点

2.4 miR-381 靶向 TMEM16A 对 AGS 细胞增殖的影响 采用 MTT 法检测各组细胞的增殖活性, 结果显示, 与空白对照组相比, miR-381-mimics 组、TMEM16A-siRNA 组及联合组细胞增殖明显被抑制, 具体 OD 值见表 4; 采用 Western blot 法检测各组细胞中 p27 的相对表达量, 结果如图 2 所示, 空白对照组、miR-381-mimics 组、TMEM16A-siRNA 组及联合组 p27 的相对表达量分别为 1.00 ± 0.11 、 1.29 ± 0.13 、 1.34 ± 0.12 及 1.56 ± 0.14 , 差异有统计学意义 ($F = 16.854, P < 0.001$); 与空白对照组相比, 其余各组 p27 的表达均增加 ($q_{\text{miR-381-mimics}} = 5.167, P = 0.002$; $q_{\text{TMEM16A-siRNA}} = 6.058, P = 0.002$; $q_{\text{联合组}} = 9.978, P < 0.001$)。

表4 各组细胞 OD_{570nm} 值的比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
空白对照	0.35 ± 0.06	0.78 ± 0.11	1.36 ± 0.14	2.24 ± 0.17
miR-381-mimics	0.38 ± 0.05	0.61 ± 0.09	1.13 ± 0.11	1.96 ± 0.14
TMEM16A-siRNA	0.33 ± 0.07	0.56 ± 0.08	1.05 ± 0.10	1.73 ± 0.13
联合	0.36 ± 0.08	0.42 ± 0.10	0.86 ± 0.12	1.56 ± 0.14
<i>F</i>	0.498	12.072	15.282	20.445
<i>P</i>	0.689	<0.001	<0.001	<0.001

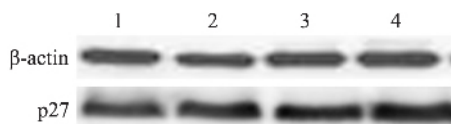


图2 miR-381 靶向 TMEM16A 对 AGS 细胞中 p27 表达的影响

1: 空白对照组; 2: miR-381-mimics 组; 3: TMEM16A-siRNA 组; 4: 联合组

2.5 miR-381 靶向 TMEM16A 对 AGS 细胞凋亡的影响 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率,结果显示,空白对照组、miR-381-mimics 组、TMEM16A-siRNA 组及联合组细胞凋亡率分别为 $(3.41 \pm 0.82) \%$ 、 $(13.54 \pm 2.51) \%$ 、 $(16.78 \pm 3.16) \%$ 及 $(22.37 \pm 3.58) \%$, 差异有统计学意义 ($F=42.574, P<0.001$); 与空白对照组相比, miR-381-mimics 组、TMEM16A-siRNA 组及联合组细胞凋亡率明显增加 ($q_{\text{miR-381-mimics}} = 8.302, P<0.001$; $q_{\text{TMEM16A-siRNA}} = 10.958, P<0.001$; $q_{\text{联合组}} = 15.539, P<0.001$)。采用 Western blot 法检测各组细胞中 caspase-3、caspase-9 的相对表达量,结果如图3、表5所示,与空白对照组相比,其余各组细胞中 caspase-3、caspase-9 的相对表达量明显增加 (caspase-3: $q_{\text{miR-381-mimics}} = 5.912, P<0.001$; $q_{\text{TMEM16A-siRNA}} = 6.651, P<0.001$; $q_{\text{联合组}} = 9.791, P<0.001$ 。caspase-9: $q_{\text{miR-381-mimics}} = 3.367, P=0.030$; $q_{\text{TMEM16A-siRNA}} = 5.316, P=0.005$; $q_{\text{联合组}} = 8.505, P<0.001$)。

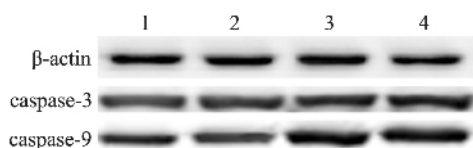


图3 miR-381 靶向 TMEM16A

对 AGS 细胞中 caspase-3、caspase-9 表达的影响

1: 空白对照组; 2: miR-381-mimics 组; 3: TMEM16A-siRNA 组; 4: 联合组

2.6 miR-381 靶向 TMEM16A 对 AGS 细胞侵袭的影响 采用 Transwell 小室法检测各组细胞侵袭能力,结果显示,空白对照组、miR-381-mimics 组、TMEM16A-siRNA 组及联合组侵袭细胞数分别为

(186.25 ± 22.47) 个、 (83.46 ± 16.72) 个、 (41.96 ± 14.08) 个及 (25.34 ± 6.57) 个, 差异有统计学意义 ($F=101.790, P<0.001$); 与空白对照组相比, miR-381-mimics 组、TMEM16A-siRNA 组及联合组侵袭细胞数明显下降 ($q_{\text{miR-381-mimics}} = 14.352, P<0.001$; $q_{\text{TMEM16A-siRNA}} = 20.147, P<0.001$; $q_{\text{联合组}} = 22.467, P<0.001$)。采用 Western blot 法检测各组细胞中 E-cadherin、Vimentin、MMP-2 及 MMP-9 的相对表达量,结果如图4、表6所示,与空白对照组相比,其余各组细胞中 Vimentin、MMP-2 及 MMP-9 的表达明显下降 (Vimentin: $q_{\text{miR-381-mimics}} = 4.002, P=0.012$; $q_{\text{TMEM16A-siRNA}} = 8.804, P<0.001$; $q_{\text{联合组}} = 17.875, P<0.001$; MMP-2: $q_{\text{miR-381-mimics}} = 6.521, P<0.001$; $q_{\text{TMEM16A-siRNA}} = 12.259, P<0.001$; $q_{\text{联合组}} = 20.605, P<0.001$; MMP-9: $q_{\text{miR-381-mimics}} = 9.141, P<0.001$; $q_{\text{TMEM16A-siRNA}} = 10.911, P<0.001$; $q_{\text{联合组}} = 18.578, P<0.001$)。E-cadherin 的表达明显增加 (miR-381-mimics $= 5.240, P=0.002$; $q_{\text{TMEM16A-siRNA}} = 7.569, P<0.001$; $q_{\text{联合组}} = 8.927, P<0.001$)。

表5 各组细胞中 caspase-3、caspase-9 相对表达量的比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	caspase-3	caspase-9
空白对照	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.08
miR-381-mimics	1.32 ± 0.10	1.19 ± 0.11
TMEM16A-siRNA	1.36 ± 0.13	1.30 ± 0.14
联合	1.53 ± 0.14	1.48 ± 0.16
<i>F</i>	16.709	12.692
<i>P</i>	<0.001	<0.001

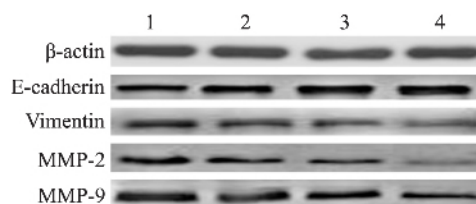


图4 miR-381 靶向 TMEM16A 对 AGS 细胞中

E-cadherin、Vimentin、MMP-2 及 MMP-9 表达的影响

1: 空白对照组; 2: miR-381-mimics 组; 3: TMEM16A-siRNA 组; 4: 联合组

表6 各组细胞中 E-cadherin、Vimentin、MMP-2 及 MMP-9 相对表达量的比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	E-cadherin	Vimentin	MMP-2	MMP-9
空白对照	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09
miR-381-mimics	1.27 ± 0.13	0.85 ± 0.08	0.75 ± 0.10	0.69 ± 0.07
TMEM16A-siRNA	1.39 ± 0.12	0.67 ± 0.09	0.53 ± 0.07	0.63 ± 0.08
联合	1.46 ± 0.13	0.33 ± 0.06	0.21 ± 0.08	0.37 ± 0.06
F	15.443	59.235	76.525	58.225
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

miR-381 定位于染色体 14q32.31 位点,该位点还包含有多种肿瘤抑制靶点 miR-154、miR-377 等。Tang et al^[8] 研究指出,miR-381 在胶质瘤中表达增加,可促进肿瘤的恶性进展。而 Xia et al^[10] 研究发现,miR-381 可通过下调 YY1 抑制上皮性卵巢癌。上述研究表明,miR-381 在不同的肿瘤类型中发挥着抗癌或促癌作用,因此,针对 miR-381 的肿瘤治疗必须考虑其双重调控功能。本研究结果显示,miR-381 在胃癌组织和细胞系中呈低表达,与王丽等^[11] 研究结果一致。miRNA 的调控机制是非常复杂的,可参与 DNA 拷贝数变化、DNA 甲基化、组蛋白修饰等过程,而且调控可发生于多个水平,如转录前、转录时及转录后。

TMEM16A 是一种潜在的致癌基因,可调节胞内氯离子浓度激活 MAPK 信号通路,促进肿瘤的发生发展。Liu et al^[12] 研究发现,过表达 TMEM16A 可能通过 TGF- β 信号通路促进胃癌细胞的增殖和侵袭,提示 TMEM16A 与胃癌细胞的生物学行为密切相关。本研究通过在线生物信息学预测软件和双荧光素酶实验证实 miR-381 和 TMEM16A 的靶向关系,同时过表达 miR-381 的 AGS 细胞中 TMEM16A mRNA 表达下降,进一步验证 miR-381 可负向调控 TMEM16A 的表达。

本研究显示,miR-381 可靶向 TMEM16A 抑制胃癌细胞 AGS 的增殖和侵袭,并促进其凋亡。P27 蛋白是细胞周期素依赖激酶抑制剂,可抑制细胞由 G1 期进入 S 期^[13],因此,P27 低表达可以加速细胞周期的进程,促进细胞增殖。本研究结果显示,miR-381 可靶向 TMEM16A 促进 P27 的表达,提示 miR-381 可靶向 TMEM16A 抑制胃癌细胞 AGS 的增殖,可能与上调 P27 的表达有关。Caspase 家族与真核细胞凋亡密切相关,Caspase-9 是凋亡的触发剂,而 Caspase-3 是凋亡的直接执行者^[14]。本研究显示,miR-381 可靶向 TMEM16A 促进 Caspase-3、Caspase-9 的表达,揭示 miR-381 可靶向 TMEM16A 促进胃癌

细胞 AGS 的凋亡,可能与上调 Caspase-3、Caspase-9 的表达有关。上皮间质转化是肿瘤细胞发生侵袭和迁移过程的重要生物学机制,E-cadherin 是肿瘤浸润抑制基因,可增强细胞简单黏附作用,维持细胞骨架的稳定,阻碍肿瘤细胞的侵袭;Vimentin 是间质细胞中的纤维蛋白,可用于评估上皮性肿瘤有无转移;MMP 家族可有效分解基底膜和细胞外基质的主要成分,促进肿瘤细胞对邻近组织的侵袭^[15]。本研究显示,miR-381 可靶向 TMEM16A 促进 E-cadherin 的表达,抑制 Vimentin、MMP-2 及 MMP-9 的表达,提示 miR-381 可靶向 TMEM16A 抑制胃癌细胞 AGS 的侵袭,可能与调控上皮间质转化相关基因 E-cadherin、Vimentin、MMP-2 及 MMP-9 的表达有关。

总之,本研究显示 miR-381 在胃癌中低表达,并靶向 TMEM16A 抑制胃癌细胞的增殖和侵袭,促进其凋亡,可能与调控 P27、Caspase-3、Caspase-9、E-cadherin、Vimentin、MMP-2 及 MMP-9 的表达有关。后续将选用动物模型,深入探究 miR-381 靶向 TMEM16A 对胃癌的影响。

参考文献

- [1] Feng A, Yuan X, Li X. MicroRNA-345 inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer by targeting FOXQ1 [J]. Oncol Rep, 2017, 38(5): 2752-60.
- [2] Cheng C J, Bahal R, Babar I A, et al. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment [J]. Nature, 2015, 518(7537): 107-10.
- [3] Lin S, Gregory R I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(6): 321-33.
- [4] 李丽平, 叶俊, 吴舜, 等. miRNA-381 对胃癌细胞增殖和侵袭的影响及机制 [J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(6): 9-14.
- [5] Dang S, Feng S, Tien J, et al. Cryo-EM structures of the TMEM16A calcium-activated chloride channel [J]. Nature, 2017, 552(7685): 426-9.
- [6] Cao Q, Liu F, Ji K, et al. MicroRNA-381 inhibits the metastasis of gastric cancer by targeting TMEM16A expression [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 29-44.
- [7] Zhang M, Huang S, Long D. MiR-381 inhibits migration and in-

- vasion in human gastric carcinoma through downregulatedting SOX4 [1]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3):3760–6.
- [8] Kulkarni S, Bill A, Godse N R, et al. TMEM16A/ANO1 suppression improves response to antibody-mediated targeted therapy of EGFR and HER2/ERBB2 [1]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2017, 56(6):460–71.
- [9] Tang H, Wang Z, Liu Q, et al. Disturbing miR-182 and -381 inhibits BRD7 transcription and glioma growth by directly targeting LRRC4 [1]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e84146.
- [10] Xia B, Li H, Yang S, et al. MiR-381 inhibits epithelial ovarian cancer malignancy via YY1 suppression [1]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7):9157–67.
- [11] 王丽, 田美娟, 张佳. 胃癌中 microRNA-381 的表达及与临床病理参数和预后的关系 [1]. *现代肿瘤医学*, 2018, 250(16):88–90.
- [12] Liu F, Cao Q H, Lu D J, et al. TMEM16A overexpression contributes to tumor invasion and poor prognosis of human gastric cancer through TGF- β signaling [1]. *Oncotarget*, 2015, 6(13):11585–99.
- [13] Hou D, Che Z, Chen P, et al. Suppression of AURKA alleviates p27 inhibition on Bax cleavage and induces more intensive apoptosis in gastric cancer [1]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(8):781–4.
- [14] Chiang J H, Yang J S, Ma C Y, et al. Danthron, an anthraquinone derivative, induces DNA damage and caspase cascades-mediated apoptosis in SNU-1 human gastric cancer cells through mitochondrial permeability transition pores and bax-triggered pathways [1]. *Chem Res Toxicol*, 2015, 24(1):20–9.
- [15] Gao H, Lan X, Li S, et al. Relationships of MMP-9, E-cadherin, and VEGF expression with clinicopathological features and response to chemosensitivity in gastric cancer [1]. *Tumour Biol*, 2017, 39(5):1–7.

Effects of miR-381 on proliferation and invasion of gastric cancer cells by targeting TMEM16A

Ke Chao, Jiang Bin, Zhou Hongjian, et al

(¹Dept of Gastrointestinal, Abdominal Wall and Hernia Surgery, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060)

Abstract Objective To explore the effects of miR-381 on proliferation and invasion of gastric cancer cells by targeting transmembrane protein 16A (TMEM16A) and its mechanism. **Methods** 34 gastric cancer patients who underwent surgical resection were enrolled. Their cancer tissues and adjacent normal tissues (less than 3 cm away from the cancer) were collected. The gastric cancer cells AGS, MKN45 and SGC7901, and normal human gastric mucosal cells GES-1 were cultured. The expression of miR-381 in tissues and cells was detected by qRT-PCR. The miR-381-mimics and TMEM16A-siRNA were transfected into AGS cells. The blank control group was set up. The expression of miR-381 and TMEM16A mRNA in cells was detected. The targeted relationship between miR-381 and TMEM16A was analyzed by online bioinformatics prediction software and dual-luciferase reporter assay. The cell proliferation was detected by MTT assay. The apoptosis was detected by flow cytometry. The cells invasion ability was detected by Transwell chamber. The expression of p27 gene, cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme (caspase-3, caspase-9), E-cadherin, Vimentin and matrix metalloproteinase (MMP-2, MMP-9) in cells was detected by Western blot. **Results** Compared with normal tissues and normal gastric mucosa cells, the expression of miR-381 in gastric cancer tissues and cells decreased ($P < 0.05$), while expression of TMEM16A mRNA increased ($P < 0.05$). Compared with blank control group, the expression of miR-381 increased, while the expression of TMEM16A mRNA decreased in miR-381-mimics group ($P < 0.05$), the expression of TMEM16A mRNA decreased in TMEM16A-siRNA group ($P < 0.05$), and the expression of miR-381 increased in combination transfection group ($P < 0.05$). However, there was no significant difference compared with that in miR-381-mimics group ($P > 0.05$). The expression of TMEM16A mRNA decreased ($P < 0.05$), which was lower than that in miR-381-mimics group and TMEM16A-siRNA group ($P < 0.05$). Compared with blank control group, cell proliferation in miR-381-mimics group, TMEM16A-siRNA group and combination group was significantly inhibited, the apoptosis and the expression of p27, caspase-3, caspase-9 and E-cadherin increased, while the number of cell invasion, expression of Vimentin, MMP-2 and MMP-9 decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** MiR-381 can inhibit proliferation and invasion of gastric cancer AGS cells by negatively regulating TMEM16A, and promote their apoptosis.

Key words miR-381; TMEM16A; gastric cancer; proliferation; invasion