

网络出版时间: 2020-5-8 15:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200507.0934.014.html>

miR-106a-5p 靶向 ERK2 逆转胃癌细胞 MGC-803 对顺铂化疗的耐药性

刘 耿 李永坤 刘洪锋

摘要 目的 探究 miR-106a-5p 与细胞外调节蛋白激酶(ERK2)的靶向作用关系对胃癌细胞 MGC-803 顺铂耐药性的影响。方法 通过 RT-PCR 检测 miR-106a-5p 与 ERK2 在胃癌细胞 MGC-803 和耐药细胞株 MGC-803/顺铂(DDP)中的表达差异; 荧光素酶报告实验确定 miR-106a-5p 与 ERK2 的靶向关系; 将 miR-106a-5p mimic 与过表达载体 pcDNA3.1-ERK(pc-ERK) 分别转染至耐药细胞株 MGC-803/DDP 中, 并分为 control 组、mimic 组、ERK2 组和 mimic + ERK2 共转染组。MTT 和 EDU 检测细胞增殖活力, Hoechst33342 检测细胞凋亡水平, Transwell 检测细胞侵袭能力, 通过 Western blot 检测各组细胞中 E-钙黏附蛋白(E-cad)、N-钙黏附蛋白(N-cad) 的表达水平。结果 胃癌细胞 MGC-803 中 miR-106a-5p 的表达量高于耐药细胞株($P < 0.05$), 而 ERK2 的表达量低于耐药细胞株($P < 0.05$)。其次, 荧光素酶报告实验表明 miR-106a-5p 靶向抑制 ERK2 的表达。转染 miR-106a-5p mimic 和 pc-ERK 之后, 与对照组相比, ERK2 组细胞的活力、细胞增殖数量和细胞侵袭数量均升高($P < 0.05$), 凋亡数量减少($P < 0.05$); mimic 组中细胞的活力、细胞增殖数量和细胞侵袭数量较对照组均下降($P < 0.05$), 凋亡数量增多($P < 0.05$); 而与 ERK2 组相比, mimic + ERK2 组细胞的活力、细胞增殖数量和细胞侵袭数量下降($P < 0.05$), 凋亡数量增多($P < 0.05$)。最后, 与对照组相比, miR-106a-5p mimic 组中 E-cad 表达量升高($P < 0.05$), 而 N-cad 表达量下降($P < 0.05$); 而 ERK2 组中 E-cad 表达量下降($P < 0.05$), 而 N-cad 表达量升高($P < 0.05$); 与 ERK2 组相比, mimic + ERK2 组中 E-cad 表达量上升($P < 0.05$), 而 N-cad 表达量下降($P < 0.05$)。结论 miR-106a-5p 可通过靶向下调 ERK2 的表达, 降低胃癌细胞对顺铂的耐药性, 有望联合临上顺铂化疗方案并提高顺铂化疗疗效。

关键词 miR-106a-5p; ERK2; 胃癌细胞 MGC-803; 顺铂; 耐药性

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)05-0722-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.05.014

2020-01-10 接收

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(编号: 201601355)

作者单位: 南阳医学高等专科学校第一附属医院普通外科, 南阳 473000

作者简介: 刘 耿, 男, 主治医师, 责任作者, E-mail: liugeng_ny@163.com

胃癌是世界上最常见的癌症之一, 具有较高的发病率和死亡率, 给社会造成巨大经济负担。而诱发胃癌的因素众多, 包括饮食、遗传、幽门螺杆菌感染等, 与年龄和性别也存在相关性, 且由于前期隐匿性较强导致延误治疗^[1]。目前, 顺铂化疗作为晚期胃癌的一线治疗方案, 在对患者的治疗中体现出不同的治疗效果, 而这可能是由于癌组织中基因表达异常导致化疗药物耐药性产生所造成的。有研究^[2]显示 miRNA 的异常表达可能是降低化疗敏感性的重要原因。近年来, 对 miRNA 的深入研究^[3]显示 miRNA 在肿瘤的发生发展中扮演着重要角色, 可作为恶性肿瘤诊断和预后标志物。miR-106a-5p 作为 miR-17 家族的一员, 被报道调控多种肿瘤和癌症发生发展, 如: 肾细胞癌^[4]、骨肉瘤^[5]、星形细胞瘤^[6]等。已有相关研究显示, miR-106a-5p 前体 miR-106a 可以逆转人脑胶质瘤细胞对顺铂和吉非替尼的耐药性^[7]。而细胞外调节蛋白激酶(Extra-cellular regulated protein kinases, ERK), 包括 ERK1 和 ERK2, 是调控细胞增殖分化、凋亡和癌变的关键因子。现通过研究 miR-106a-5p 对胃癌细胞中 ERK2 的表达以及对临床胃癌顺铂化疗的敏感性的影响, 为临上癌症的治疗提供依据和新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; 人胃癌细胞系 MGC-803 购自上海吉凯基因化学技术有限公司; 顺铂(DDP) 购自美国 Hospira 公司; TRIzol Reagent、TaqMan miRNA 反转录试剂盒、TaqMan miRNA 定量 PCR 试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司; 反转录试剂盒、PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; Lipofectamine[®] 2000 试剂购自美国 Invitrogen 公司; EDU 细胞增殖检测试剂盒、hochest33342 染料购自北京索莱宝公司; E-钙黏蛋白(E-Cadherin, E-Cad)、N-钙黏蛋白(N-Cadherin, N-Cad)、GAPDH 抗体均购自美国 CST 公司。

1.2 细胞培养及耐药株细胞的建立 胃癌细胞 MGC-803 培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基,

放置于 5% CO₂、37 °C 的培养箱内,传代 3 次后用于后续试验。在胃癌细胞 MGC-803 生长到对数期时从低浓度 DDP(0.5 mg/L) 开始诱导细胞,每 2 d 更换培养液,去除死亡细胞后待细胞状态稳定且再次达到对数生长期继续传代细胞,且增加 25% 的药物浓度。持续诱导 6 个月后,以细胞能够稳定的存活于含高浓度(5 mg/L) 的 DDP 培养液中且可以连续传代培养,无细胞的明显死亡后说明顺铂耐药细胞株 MGC-803/DDP 建立成功。耐药细胞株 MGC-803/DDP 的培养方式与胃癌细胞 MGC-803 相同。

1.3 RT-PCR 检测 将两种细胞均以 1×10^5 个/孔培养于 6 孔板,待细胞贴壁,用 PBS 清洗细胞并提取总 RNA,通过超微量核算蛋白测定仪测定浓度。用 TaqMan miRNA 反转录试剂盒或 Takara 反转录试剂盒合成 cDNA。引物序列如下: miR-106a-5p 正向: 5'-GATGCTAAAAAGTGCTTA CAGTGCA-3'; miR-106a-5p 反向: 5'-TATGGTTGTTCTGCTCTCT-GTCTC-3'; ERK2 正向: 5'-AGGCTGTTCCAAAT-GCT-3'; ERK2 反向: 5'-CGTCACTGGGTCTCGTAAT-3'。miR-106a-5p PCR 扩增条件: 预变性 95 °C、10 s, 变性 95 °C、10 s, 退火 60 °C、20 s, 40 个循环。ERK2 扩增条件: 预变性 94 °C、10 s, 变性 45 s, 退火 59 °C、45 s, 35 个循环, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

1.4 细胞转染 将 MGC-803/DDP 细胞以 1×10^5 个/孔的密度培养于 6 孔板,待其生长密度达到 50% 时才可用于转染。操作步骤按照转染试剂盒执行即可。转染 8 h 后将培养液更换为含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基进行培养,48 h 后用于后续试验。

1.5 荧光素酶报告基因检测 应用生物信息学软件 PicTar、TargetScan 数据库对 miR-106a-5p 可能的靶基因进行预测。构建 ERK2 野生型(WT) 和突变型(MUT) pGL3-荧光素酶报告载体。将耐药细胞株 MGC-803/DDP 细胞分为 WT 组、MUT 组、WT + miR-106a-5p mimics 组和 MUT + miR-106a-5p mimics 组,培养于 24 孔板,每组 3 个复孔,按分组情况分别进行转染 48 h 后通过荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶活性。

1.6 MTT 检测细胞活性 将 ERK2 构建到 pcDNA3.1 质粒,转染空载质粒和 pc-ERK2 至耐药细胞株 MGC-803/DDP 中,48 h 后通过 RT-PCR 检测 ERK2 表达情况,确认过表达成功。分别转染 miR-106a-5p mimic 和 pc-ERK2 至耐药细胞株 MGC-803/DDP,并分为 Control(对照) 组、mimic NC(阴性对照) 组、miR-106a-5p mimic (miR-106a-5p 高表达)

组、ERK2(ERK2 高表达) 组和 mimic + ERK2(共转染) 组。将转染后细胞以 5×10^3 个/孔的密度培养于 96 孔板,各组 6 个复孔。加入 20 μ mol/L 的 DDP 5 μ l 处理细胞 24 h,每孔加入 10 μ l MTT 溶液,继续孵育 4 h。各孔加入 100 μ l Formanzan 溶解液,孵育至紫色结晶会全部溶解。在 570 nm 测定吸光度。

1.7 EdU 染色 转染后各组细胞中加入 20 μ mol/L 的 DDP 5 μ l 处理 24 h,后续步骤按照 EDU 细胞增殖检测试剂盒操作说明进行。每孔加入 50 μ mol/L EdU 100 μ l 至培养基孵育 2 h, PBS 清洗细胞,每孔加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,弃去固定液;每孔加入甘氨酸中和固定液, PBS 清洗;每孔加入 100 μ l 渗透剂后孵育 10 min; PBS 清洗;每孔加入 100 μ l 的 1 × Apollo 染色液,孵育 30 min,弃去染色反应液;加入 100 μ l 0.5% Triton X-100 清洗 2 ~ 3 次;每孔加入 100 μ l 甲醇清洗后再 PBS 清洗。每孔加入 100 μ l 1 × Hoechst 33342 反应液,孵育 30 min 后, PBS 清洗;图像获取及分析。

1.8 Hoechst33342 染色检测细胞凋亡 将 MGC-803/DDP 细胞培养于有细胞爬片的 6 孔板,分组同上。分别将 miR-106a mimics 和 pc-ERK2 按分组转染至 MGC-803/DDP 细胞 48 h 后换液,除对照组外均加入 DDP 处理 24 h。各孔弃去培养液, PBS 清洗细胞 3 次,加入 hoechst33342 染液,于保温箱中孵育 30 min 后弃去染液, PBS 清洗 3 次,滴加抗荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片。激发波长 350 nm 左右,发射波长 460 nm 左右,荧光显微镜下检测拍照。

1.9 Transwell 检测细胞侵袭 将各转染组胃癌细胞以 1×10^5 /ml 密度,接种 200 μ l 于铺有 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室上室,下室加入 600 μ l 含 20% FBS 的 RPMI 1640 培养基。37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,用棉签擦去基质胶和上室未穿膜细胞,甲醇固定 10 min, Giemsa 染色 30 min, 镜下随机 5 个视野(1 × 100) 观察结果并拍照、计数,取均值。

1.10 Western blot 检测 将各转染组胃癌细胞以 1×10^5 个/孔培养于 6 孔板,细胞贴壁后, DDP 处理 24 h,用 PBS 清洗细胞,用含有 PMSF 的 RIPA 裂解液裂解细胞,提取总蛋白。BCA 试剂盒检测蛋白浓度后,经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳进行电泳,分别孵育相应的一抗、二抗,加入 BCL,进行曝光。

1.11 统计学处理 所有实验数据均用统计软件 SPSS 19.0 进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两

两比较用独立的 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-106a-5p 和 ERK2 在两种细胞系中表达量的差异 通过 RT-PCR 检测 miR-106a-5p 和 ERK2 在胃癌细胞株 MGC-803 和顺铂耐药细胞株 MGC-803/DDP 中的表达差异。如图 1 所示,以胃癌细胞株 MGC-803 为对照组,miR-106a-5p 在顺铂耐药细胞株中的表达降低($t = 10.31, P < 0.05$),而 ERK2 mRNA 的表达上升($t = 8.95, P < 0.05$)。由此可见,miR-106a-5p、ERK2 在胃癌细胞株 MGC-803 和顺铂耐药细胞株中的表达量呈相反趋势。

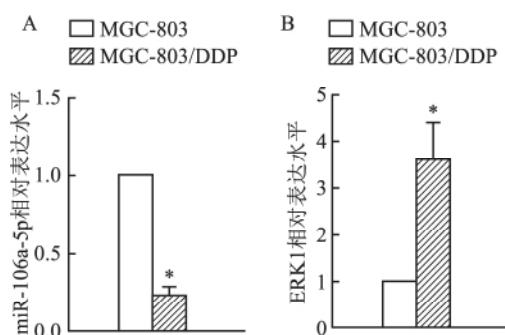


图 1 RT-PCR 检测 miR-106a-5p 和 ERK2 在两种细胞系中的表达量

A: 两种细胞系中 miR-106a-5p 表达量; B: 两种细胞系中 ERK1 表达量; 与 MGC803 比较: * $P < 0.05$

2.2 miR-106a-5p 靶向下调 ERK2 基因 将 miR-106a-5p 转染到 MGC-803/DDP 细胞,通过 RT-PCR 检测 miR-106a-5p 的表达量。与对照组相比,miR-106a-5p mimic 转染组中 miR-106a-5p 的表达量升高($t = 21.14, P < 0.05$),见图 2A。生物学预测 miR-106a-5p 与 ERK2 的靶向关系。ERK2 基因序列上存在 miR-106a-5p 的结合位点,见图 2B。通过荧光素酶报告基因试验进一步证实 miR-106a-5p 与 ERK2 的靶向关系。miR-106a-5p 靶向下调 ERK2 的表达($t = 5.38, P < 0.05$),见图 2C。由此可见,miR-106a-5p 靶向作用于 ERK2 基因,且下调 ERK2 的表达量。

2.3 miR-106a-5p 过表达逆转 ERK2 诱导的胃癌细胞活性增强与增殖 将 pc-ERK2 转染到 MGC-803/DDP 细胞,通过 RT-PCR 确认 ERK2 的过表达。ERK2 组中 ERK2 的表达量高于对照组($t = 18.22, P < 0.05$),见图 3A。将 miR-106a-5p mimic 和 pc-ERK2 分别转染到 MGC-803/DDP 细胞,经 20

$\mu\text{mol/L}$ DDP 处理后通过 MTT 法检测细胞活力。与对照组相比,miR-106a-5p mimic 组的细胞活力下降($t = 25.37, P < 0.05$),而 ERK2 组细胞活力上升($t = 9.32, P < 0.05$),见图 3B。与 ERK2 组相比,mimic + ERK2 组的活力下降($t = 4.82, P < 0.05$)。通过 EDU 染色检测各组细胞增殖情况。与对照组(42 ± 14)相比,miR-106a-5p mimic 组(12 ± 8)的细胞增殖数量下降($t = 7.86, P < 0.05$),而 ERK2 组(75 ± 17)细胞增殖数量上升($t = 13.66, P < 0.05$)。与 ERK2 组相比,mimic + ERK2 组(51 ± 12)细胞增殖数量下降($t = 4.26, P < 0.05$),见图 3C。由此可见,ERK2 的高表达可以提高 MGC-803/DDP 细胞在顺铂作用下的细胞活性并诱导其增殖,而 miR-106a-5p 的高表达则可以逆转 ERK2 高表达带来的影响。

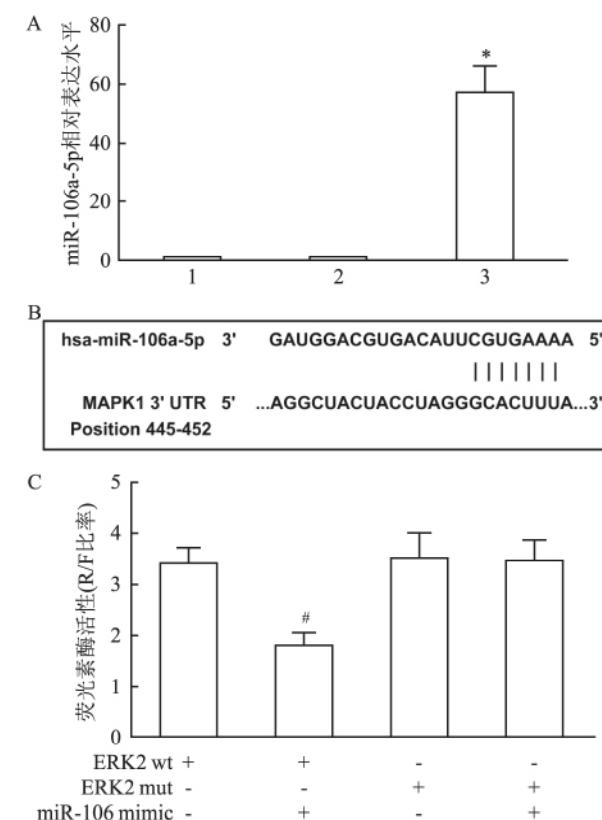


图 2 miR-106a-5p 与 ERK2 基因的靶向关系

A: miR-106a-5p 转染效果; 1: Control 组; 2: mimic NC 组; 3: miR-106a-5p mimic 组; B: miR-106a-5p 与 ERK2 基因靶向序列预测; C: 荧光素酶报告实验检测靶向关系; 与 Control 比较: * $P < 0.05$; 与 ERK2 wt 组比较: # $P < 0.05$

2.4 miR-106a-5p 过表达逆转 ERK2 诱导的 MGC-803/DDP 细胞凋亡减少 通过 hochest33342 染色检测各组 MGC-803/DDP 细胞凋亡情况。与对照组(3.9 ± 2.0)相比,miR-106a-5p mimic 组(42.4 ± 6.8)细胞凋亡数量升高($t = 17.02, P < 0.05$),而

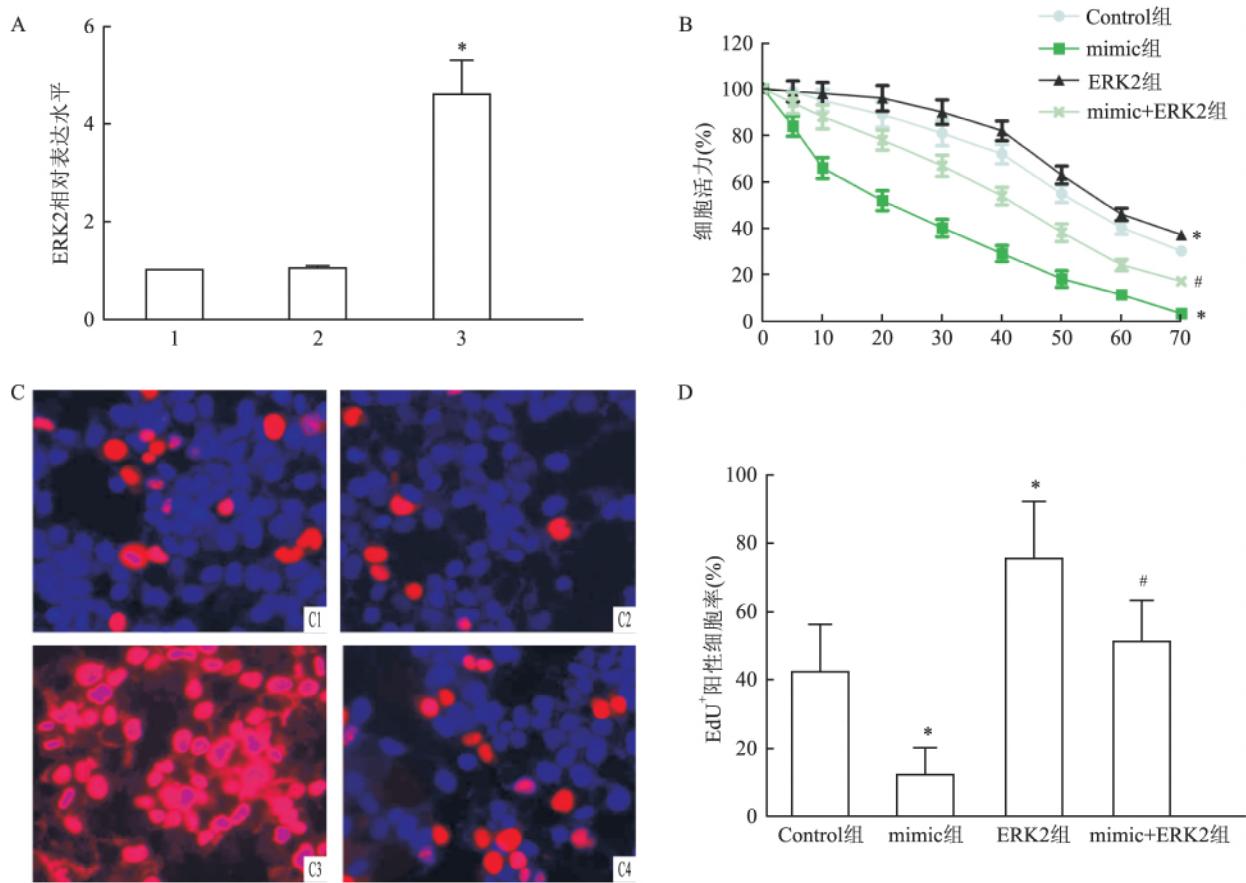


图3 MTT法和EDU染色法检测胃癌细胞MGC-803/DDP的活力与增殖情况

A: pc-ERK2 转染效率; 1: Control 组; 2: Vector 组; 3: ERK2 组; 4: mimic + ERK2 组; B: MTT 检测不同浓度 DDP 处理下 MGC-803/DDP 细胞活力; C: EdU 检测 MGC-803/DDP 细胞增殖 $\times 400$; 1: Control 组; 2: mimic 组; 3: ERK2 组; 4: mimic + ERK2 组; D: EdU⁺ 阳性细胞率; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 ERK2 组比较: # $P < 0.05$

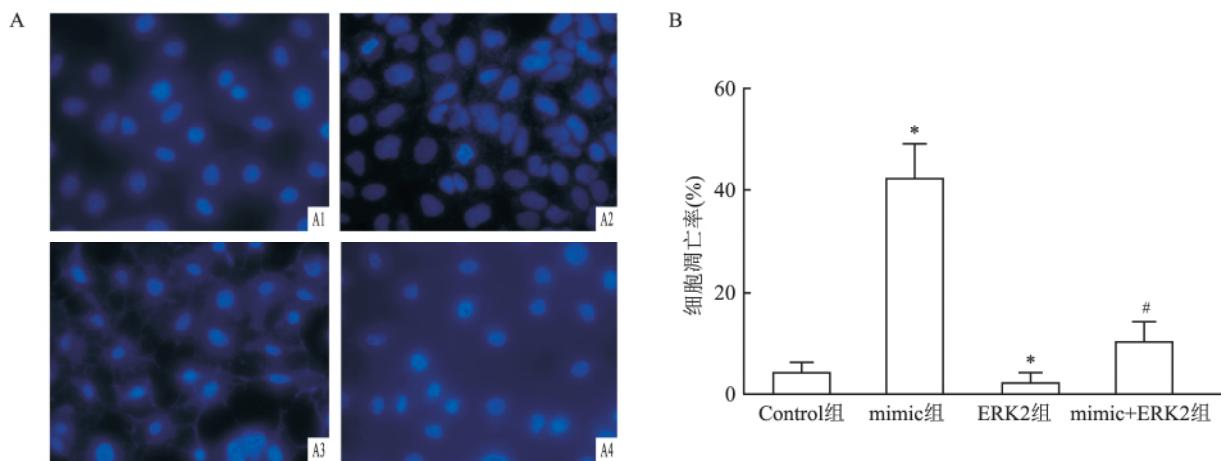


图4 Hoechst33342染色法检测MGC-803/DDP细胞的凋亡情况

A: Hoechst33342 检测细胞凋亡 $\times 400$; 1: Control 组; 2: mimic 组; 3: ERK2 组; 4: mimic + ERK2 组; B: MGC-803/DDP 细胞凋亡百分率; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 ERK2 组比较: # $P < 0.05$

ERK2 组(2.0 ± 1.7) 细胞凋亡数量减少($t = 15.85$, $P < 0.05$)。见图 4。与 ERK2 组相比, mimic + ERK2 组(10.2 ± 4.2) 中细胞凋亡数量上升($t =$

8.80 , $P < 0.05$)。由此可见, miR-106a-5p 过表达可逆转 ERK2 过表达诱导的 MGC-803/DDP 细胞凋亡水平降低。

2.5 miR-106a-5p 过表达逆转 ERK2 诱导的 MGC-803/DDP 细胞侵袭力增强 通过 Transwell 检测各组 MGC-803/DDP 细胞侵袭力的改变。如图 5 所示,与对照组(63 ± 19)相比,miR-106a-5p mimic 组(10 ± 7)中细胞侵袭数量下降($t = 9.09, P < 0.05$),而 ERK2 组(159 ± 39)中的细胞侵袭数量上升($t = 15.49, P < 0.05$)。与 ERK2 转染组相比,miR-106a-5p + ERK2 组(54 ± 16)细胞侵袭数量下降($t = 11.24, P < 0.05$)。由此可见,miR-106a-5p 过表达逆转了 ERK2 诱导的 MGC-803/DDP 细胞侵袭数量增加。

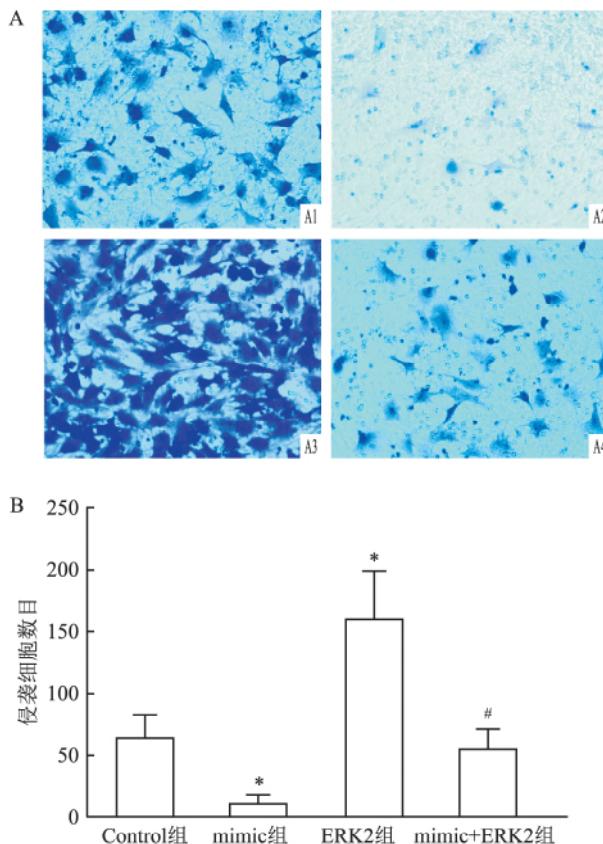


图 5 Transwell 检测 MGC-803/DDP 细胞的侵袭力

A: Transwell 检测细胞侵袭 $\times 400$; 1: Control 组; 2: mimic 组; 3: ERK2 组; 4: mimic + ERK2 组; B: MGC-803/DDP 细胞侵袭数量; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 ERK2 组比较: # $P < 0.05$

2.6 miR-106a-5p 过表达逆转 ERK2 对 EMT 标志性蛋白表达量的影响 通过 Western blot 检测各组细胞中 E-cad、N-cad 蛋白的表达情况。如图 6A 所示,与对照组相比,miR-106a-5p mimic 组中 E-cad 表达量上升($t = 9.45, P < 0.05$),N-cad 的表达量下降($t = 13.24, P < 0.05$);而 ERK2 组中 E-cad 表达量较对照组下降($t = 24.88, P < 0.05$),N-cad 表达

量上升($t = 30.22, P < 0.05$)。与 ERK2 组相比,mimic + ERK2 组中 E-cad 表达量上升($t = 18.42, P < 0.05$),而 N-cad 表达量下降($t = 15.43, P < 0.05$)。由此可见,miR-106a-5p 过表达可逆转 ERK2 过表达对上皮细胞-间充质转化中标志性蛋白表达量的影响。

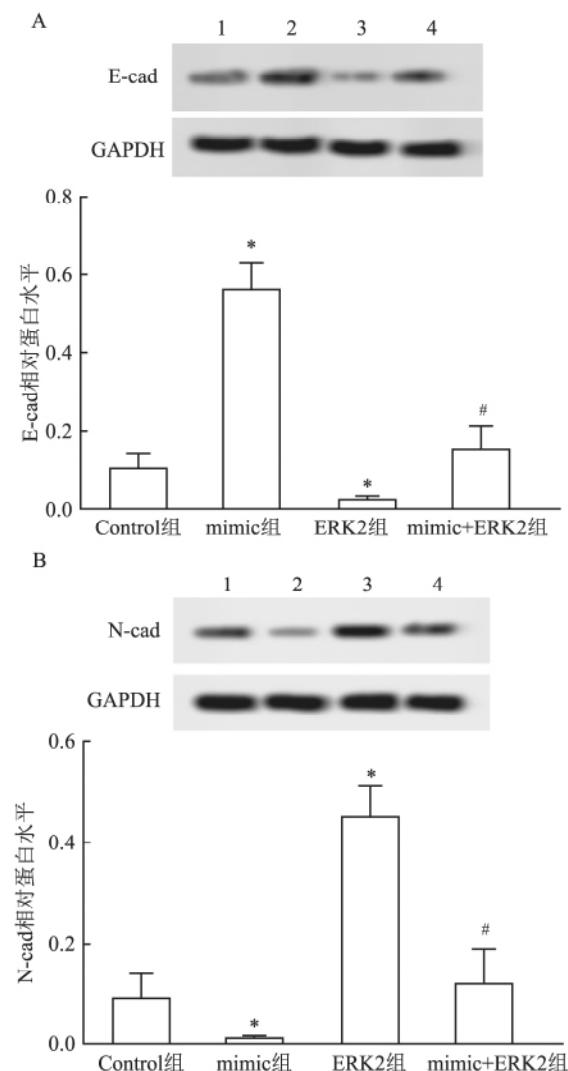


图 6 Western blot 检测 MGC-803/DDP 细胞中 E-cad、N-cad 的蛋白表达量

A: Western blot 检测细胞 E-cad 蛋白表达量; B: Western blot 检测细胞 N-cad 蛋白表达量; 1: Control 组; 2: mimic 组; 3: ERK2 组; 4: mimic + ERK2 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 ERK2 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

胃癌是一种常见的消化道恶性肿瘤疾病,目前临幊上对于胃癌的治疗方案主要是采用铂类化疗药物进行治疗^[8]。但是随着化幊次数的增多,肿瘤细

胞会对铂类化疗药物(包括顺铂)产生耐药性,而肿瘤细胞对铂类药物产生耐药性的机制较为复杂,如靶点异常表达、药物作用通路抑制、癌细胞对药物的外排增强、DNA修复能力增强等。因此,逆转顺铂的耐药性将成为提高癌症化疗效果的关键。

ERK 包括 ERK1 和 ERK2,是将信号从表面受体传导至细胞核的关键,磷酸化激活的 ERK1/2 由胞质转位到核内,进而参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞骨架的构建、细胞凋亡和细胞的癌变等多种生物学反应,其中 ERK2 即 MAPK1。miR-106a-5p 是 miR-106a 的剪切成熟体,参与着对基因表达的调控。近年来大量研究证实 ERK 在癌症的发生发展中扮演着重要的角色。李登举等^[9]发现,ERK 信号转导途径的抑制导致磷酸化 ERK1 和 ERK 2 蛋白质低表达,并连续下调端粒酶活性,最终提高卵巢癌细胞 COC1/DDP 对 DDP 的敏感性。除此之外,Ye et al^[10]发现,鼻咽癌患者血清或 NPC 细胞中 miR-106a-5p 过表达,且参与下调 MARK1 信号传导途径活性以改变细胞增殖和分化。因此推测,miR-106a-5p 可以下调 ERK2 的表达,进而逆转 MGC-803/DDP 细胞对顺铂的耐药性。

为了证实我们推测,我们通过 RT-PCR 检测了 miR-106a-5p 和 ERK2 在胃癌细胞株 MGC-803 和顺铂耐药细胞株 MGC-803/DDP 中的表达情况。结果显示,106a-5p 和 ERK2 在胃癌细胞株 MGC-803 和顺铂耐药细胞株 MGC-803/DDP 中的表达量均在负相关性。为了进一步确定 miR-106a-5p 和 ERK2 存在靶向关系,本研究通过软件分析预测了 miR-106a-5p 和 ERK2 存在的作用关系,并通过荧光素酶报告基因检测确定了 miR-106a-5p 和 ERK2 存在靶向关系。

为了探明 miR-106a-5p 和 ERK2 在胃癌细胞耐药性中的相互关系,本研究进一步将 miR-106a-5p mimic 和 pc-ERK2 分别转染至顺铂耐药细胞株 MGC-803/DDP 中,并将 DDP 作用于实验组中各组细胞,检测各组细胞活性、增殖能力、凋亡水平以及侵袭能力的改变。研究结果显示,miR-106a-5p 可以靶向 ERK2,降低 DDP 作用下顺铂耐药细胞株 MGC-803/DDP 细胞活性,并诱导其凋亡水平的升高,同时降低其增殖能力和侵袭能力。研究结果表明,miR-106a-5p 可以靶向 ERK2,逆转顺铂耐药细胞株 MGC-803/DDP 细胞对 DDP 的耐药性。

在多种癌症的发生发展中,上皮细胞失去细胞极性和与基底膜连接的粘附作用进而转化为具有间

质表型的细胞的过程称为上皮细胞-间充质转化(EMT)。大量研究显示,EMT 的过度活化在上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞中起着增强癌细胞的迁移、侵袭能力的关键作用^[11]。细胞黏附因子 E-cad 表达下调,而 N-cad 表达上调是 EMT 过程中的标志性特征^[12-14]。有相关研究显示,ERK 的磷酸化和 EMT 的激活有助于增强卵巢癌细胞 SKOV-3 对 DDP 的抗性,而 ERK 的抑制剂 PDK8059 可以逆转其耐药性的产生^[15]。本研究结果显示,miR-106a-5p 可以抑制 ERK2 诱导的 E-cad 低表达及 N-cad 的高表达,这表明,miR-106a-5p 可以靶向 ERK2 而抑制 EMT 过程,降低胃癌细胞的迁移、侵袭能力。

综上所述,miR-106a-5p 可以靶向抑制 ERK2 基因的表达,降低 DDP 作用下顺铂耐药细胞株 MGC-803/DDP 细胞活性,并诱导其凋亡水平的升高,同时降低其增殖能力和侵袭能力,逆转 EMT 过程,最终实现逆转顺铂耐药细胞株 MGC-803/DDP 细胞对 DDP 的耐药性。目前,关于 miRNA 在胃癌耐药中的研究多见于细胞株,而其对胃癌患者化疗耐药的影响研究仍较少,因此后期我们将通过建立胃癌模型大鼠,观察 miR-106a-5p 对大鼠顺铂化疗效果的影响。

参考文献

- Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-32.
- 梁志洪,陈结贞,陈永雪,等.循环肿瘤细胞(CTC)在乳腺癌预防与化疗评估中的应用[J].分子诊断与治疗杂志,2019,11(3):209-13.
- 田敬华,杨金玲,秦杰,等. miR-34 启动子甲基化在胃癌发病过程中的作用研究[J]. 分子诊断与治疗杂志,2019,11(1):17-21.
- Pan Y J, Wei L L, Wu X J, et al. MiR-106a-5p inhibits the cell migration and invasion of renal cell carcinoma through targeting PAK5 [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3155.
- He Q Y, Wang G C, Zhang H, et al. MiR-106a-5p suppresses the proliferation, migration, and invasion of osteosarcoma cells by targeting HMGA2 [J]. DNA Cell Biol, 2016, 35(9): 506.
- Zhi F, Zhou G, Shao N, et al. miR-106a-5p inhibits the proliferation and migration of astrocytoma cells and promotes apoptosis by targeting FASTK [J]. Plos One, 2013, 8(8): e72390.
- Wang Q, Wang Z, Chu L, et al. The effects and molecular mechanisms of miR-106a in multidrug resistance reversal in human glioma U87/DDP and U251/G cell lines [J]. Plos One, 2015, 10(5): e0125473.
- Marqués-Lespier J M, González-Pons M, Cruz-Correia M. Current perspectives on gastric cancer [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2016, 45(3): 413-28.

- [9] 李登举, 张瑶珍, 黄伟, 等. 抑制 ERK 增强白血病和卵巢癌耐药细胞系化疗敏感性 [J]. 中国实验血液学杂志, 2003, 11(6): 595-9.
- [10] Ye S B, Li Z L, Luo D H, et al. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(14): 5439-52.
- [11] 缪冉, 吴立胜, 代聪聪, 等. 抑制 KIAA1429 表达对人胃癌细胞侵袭和迁移的影响及其机制 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 9(54): 1372-6.
- [12] Van Roy F. Beyond e-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(2): 121.
- [13] Zhang L, Sun J, Wang B, et al. MicroRNA-40b triggers the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of laryngeal carcinoma Hep-2 cells by directly targeting the E-cadherin [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 176(1): 33-44.
- [14] Zuo J, Wen J, Lei M, et al. Hypoxia promotes the invasion and metastasis of laryngeal cancer cells via EMT [J]. *Med Oncol*, 2016, 33(2): 15.
- [15] Hou L, Hou X, Wang L, et al. PD98059 impairs the cisplatin-resistance of ovarian cancer cells by suppressing ERK pathway and epithelial-mesenchymal transition process [J]. *Cancer Biomark*, 2017, 21(1): 187-94.

miR-106a-5p targets ERK2 to reverse the resistance of gastric cancer cell MGC-803 to cisplatin chemotherapy

Liu Geng, Li Yongkun, Liu Hongfeng

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473000)

Abstract **Objective** To explore the targeting relationship between miR-106a-5p and ERK2 and its effect on cisplatin resistance of gastric cancer cell line MGC-803. **Methods** RT-PCR was used to detect the expression of miR-106a-5p and ERK2 in gastric cancer cell line MGC-803 and drug-resistant cell line MGC-803/DDP. The luciferase reporter assay was used to determine the targeting relationship between miR-106a-5p and ERK2. The miR-106a-5p mimic and overexpression vector pcDNA3.1-ERK (pc-ERK2) were transfected into drug-resistant cell line MGC-803/cisplatin (DDP), respectively. The cells were divided into control group, miR-106a-5p mimic group, ERK2 group and mimic + ERK2 group. Then MTT & EDU were used to measure cell proliferation, hoche33342 was used to observe cell apoptosis, Transwell was used to detect cell invasion. Finally, the expression levels of E-cadherin (E-cad) and N-cadherin (N-cad) in each group of cells were detected by Western blot. **Results** The expression of miR-106a-5p in gastric cancer cell line MGC-803 was significantly higher than that in drug-resistant cell line ($P < 0.05$), while the expression of ERK2 was lower than that in drug-resistant cell line ($P < 0.05$). Secondly, luciferase reporter assays had shown that miR-106a-5p targets inhibited ERK2 expression. After transfection with miR-106a-5p & pc-ERK2, compared with the control group, the viability, cell proliferation and cell invasion number of ERK2 group significantly increased ($P < 0.05$), and the number of apoptosis significantly decreased ($P < 0.05$); the viability, cell proliferation and cell invasion of the miR-106a-5p mimic group were significantly lower than those of the control group ($P < 0.05$), and the number of apoptosis significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the ERK2 group, the viability, cell proliferation and cell invasion of the mimic + ERK2 group significantly decreased ($P < 0.05$), and the number of apoptosis significantly increased ($P < 0.05$). Finally, compared with the control group, the expression of E-cad in the miR-106a-5p mimic group significantly increased ($P < 0.05$), while the expression of N-cad significantly decreased ($P < 0.05$); meanwhile the expression of E-cad in the ERK2 group significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression of N-cad was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the ERK2 group, the expression of E-cad in the mimic + ERK2 group significantly increased ($P < 0.05$), while the expression of N-cad significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Mir-106a-5p can target down-regulate the expression of ERK2 and reduce the drug resistance of gastric cancer cells. It is expected that miR-106a-5p can be combined with cisplatin chemotherapy and improve the efficacy of cisplatin chemotherapy.

Key words microRNA-106a-5p; ERK2; gastric cancer cell line MGC-803; cisplatin; drug resistance