DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2015.12.009

网络出版时间:2015 - 11 - 18 10:12:34 网络出版地址:http://www.cnki.net/KCMS/detail/34.1065.R.20151118.1012.018.html

microRNA - 137 对人胃癌 MKN - 45 细胞迁移侵袭的影响

刘晓阳[1,2],郑海伦[2],任 志[2],张 磊[1]

摘要 **目的** 研究 miR-137 过表达对人胃癌 MKN-45 细胞迁移侵袭的影响。**方法** 采用 RT-PCR 法检测 5 株胃癌细胞和人胃黏膜上皮细胞(GES)中 miR-137 的表达。构建 miR-137 慢病毒,并转染 MKN-45 细胞。通过划痕实验、细胞侵袭小室检测和 Transwell 侵袭实验以分析过表达 miR-137 对 MKN-45 细胞迁移侵袭的影响。**结果** MKN-45 细胞中 miR-137 的表达丰度明显低于在 GES、MKN-74、AGS、SGC-7901 和 BGC-823 细胞,差异有统计学意义($P<0.05$)。同时成功构建 micro up 病毒感染的细胞组。划痕实验结果显示,与空白对照组(CON 组)和阴性对照组(NC 组)比较,micro up 组 24、48 h 后平均迁移率差异有统计学意义($P<0.05$);细胞侵袭小室检测结果显示,与 CON 组、NC 组比较,micro up 组的平均迁移率差异有统计学意义($P<0.01$);Transwell 侵袭实验结果显示,与 CON 组、NC 组比较,micro up 组平均迁移率差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** miR-137 过表达能明显抑制人胃癌 MKN-45 细胞迁移侵袭能力,有可能成为胃癌治疗的新靶点。

关键词 胃癌;miR-137;MKN-45;细胞侵袭
中图分类号 R 735.2
文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2015)12 - 1748 - 05

2015 - 09 - 08 接收
基金项目:安徽高等学院省级自然科学研究项目(编号:KJ2012B103)
作者单位:[1]安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022
[2]蚌埠医学院第一附属医院消化科,蚌埠 233003
作者简介:刘晓阳,男,主治医师;
张 磊,女,副教授,主任医师,硕士生导师;责任作者;E-mail:chinazhanglei@163.com

microRNA(miR)是长度约 18 ~ 25 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA,越来越多的研究[1-2]提示 miR 几乎参与调控所有人类已知的细胞进程,在功能上充当癌基因或抑癌基因的角色,在肿瘤的发生和发展中起着重要的调控作用。胃癌是人类的常见恶性肿瘤。该研究通过在人胃癌 MKN-45 细胞中转染 miR-137 使其过表达,探讨 miR-137 对胃癌细胞侵袭和转移能力的影响,进一步揭示 miR-137 在胃癌细胞中的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料 has-miR-137、永生化正常人胃黏

Ru complex as tumor inhibitor by regulating FSCN1 in gastric cancer cells

Zhang Min[1], Xu Yuanhong[1], Dong Bingbin[2], et al
([1]*Dept of Clinical Laboratory*, [2]*Dept of General Surgery*, *The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University*, *Hefei* 230022)

Abstract ***Objective*** To study the role of FSCN1 in the proliferation of gastric cancer and the interaction between FSCN1 and Ru complex in gastric cancer. ***Methods*** The expression level of FSCN1 was measured by qRT-PCR and Western blot. The proliferation ability was tested using MTT and EdU assays. Then the mRNA and protein levels of FSCN1 in SGC-7901 cells were measured after treating with Ru complex. FSCN1 were transfected into cells, and the proliferation ability was tested using MTT and EdU assays after treating with Ru complex. ***Results*** The expression level of FSCN1 in gastric cancer tissues was higher than that in adjacent tissues. Knockdown of FSCN1 in SGC-7901 cells inhibited cell proliferation. The proliferation ability and the expression level of FSCN1 in SGC-7901 cells were decreased after treating with Ru complex. And overexpression of FSCN1 reversed the antitumor effect of Ru complex. ***Conclusion*** FSCN1 as the oncogene can regulate gastric cancer proliferation, and Ru complex reverses the course by inhibiting FSCN1 expression.

Key words FSCN1; gastric cancer; Ru complex; SGC-7901

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

膜上皮细胞(GES)、人胃癌细胞系(AGS、BCG-823、MKN-45、MKN-74、SGC-7901)、Primer(R&F)购自上海吉凯基因化学技术有限公司;Trizol、Opti-MEM 购自美国 Invitrogen 公司;DNTPs、Rnase Inhibitor、M-MLV 购自美国 Promega 公司;DMSO 购自上海生物试剂厂;Oligo dT 购自上海生工公司;SYBR Master Mixture、Real-Time PCR(RT-PCR)仪器购自日本 TaKaRa 公司;胎牛血清 FBS、DMEM 购自美国 Gibco 公司;胰酶购自上海化学试剂公司;Transwell 试剂盒购自美国 Corning 公司;Nanodrop 分光光度计购自美国 Thermo 公司;稳压电泳仪购自上海天能公司;荧光显微镜购自日本奥林帕斯公司;CO_2 培养箱购自日本三洋公司;生物安全柜购自上海振样创空气净化设备有限公司;酶标仪购自美国 Biotek 公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 实验 抽提总 RNA(根据 Trizol 操作说明书进行);逆转录 RNA 获得 cDNA(根据 M-MLV 操作说明书进行);按比例配置反应体系,两步法进行 RT-PCR,并制作熔解曲线;分析 ΔCt 值(ΔCt = 目的基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值)。PCR 产物电泳图见图 1。

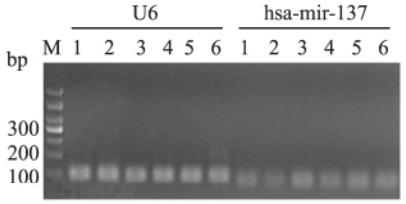

图 1 RT-PCR 产物电泳图

M: DNA Marker DL 1 000; 1: MKN-74; 2: AGS; 3: SGC-7901; 4: MKN-45; 5: GES; 6: BGC-823

1.2.2 慢病毒感染 实验分为空白对照组(CON 组)、阴性对照组(NC 组)、micro up 组。将胃癌细胞 MKN-45 复苏,用胰酶消化液将生长 90% 汇合的细胞进行传代。取处于对数生长期的目的细胞消化后制成细胞悬液接种于 6 孔板中,在 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养待细胞融合度达到约 30%,根据细胞感染复数值,加入适宜量的病毒(LV-hsa-miR-137),观察细胞毒性作用,适时更换培养基。感染 3 d 后观察慢病毒报告基因绿色荧光蛋白的表达情况,荧光率大于 80% 者,将细胞分成两份,一份分于 12 孔培养板中待长满后收集细胞用于 RNA 提取,一份分于 6 孔板中待长满后收集细胞用于蛋白提取。

1.2.3 划痕实验 按照实验设计的组别,在孔中加入约 5×10^4 个感染后的细胞。第 2 天上午换低浓度血清培养基,使用划痕仪对准 96 孔板的下端中央部位,向上轻推形成划痕。使用无血清培养基轻轻漂洗 2 遍,加入低浓度血清培养基,拍照 0 h 图片。放入 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养。荧光显微镜于 24、48 h 拍照。根据划痕后的图片,计算各组细胞迁移率(迁移率为不同拍照观察时间点迁移距离与“0 h”划痕区域宽度值的比值),比较差异。

1.2.4 细胞侵袭小室实验 从 -20 ℃ 冰箱中取出所需数目的小室到新的 24 孔板中,恢复到室温。在小室和下室中各加 500 μl、37 ℃ 温育无血清培养基,37 ℃ 培养箱中放置 2 h。对细胞悬液进行细胞计数。加 750 μl 30% FBS 培养基到下室中,加 500 μl 细胞悬液到每个小室中。在 37 ℃ 培养箱培养 64 h。去除培养基,移去非侵袭细胞。将小室浸泡在 Gimesa 染色液中 30 min,在膜的下表面染色侵入细胞。冲洗晾干小室。给小室整体拍照,显微镜拍照膜,用酶标仪在 570 nm 波长处进行光密度(optical density,OD)值检测,计算各组侵袭率,比较差异。

1.2.5 Transwell 实验 按实验分组将 3 组细胞计数后以 1×10^5/室铺于一空 24 孔板中。加 600 μl 含 30% FBS 培养基到下室中。用无血清培养基按一定比例稀释细胞,加该细胞悬液 100 μl 到每个小室中。将小室转移入含 30% FBS 培养基的下室中。在组织培养箱中培养 48 h。去除培养基,移去非转移细胞。加 400 μl 染色液到 24 孔板的空孔中,将小室浸泡在染色液中 20 min,在膜的下表面染色转移细胞。冲洗晾干后,用显微镜拍照膜,用酶标仪在 570 nm 波长处进行 OD_{570} 值检测,计算迁移率,比较各组差异。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,组间数据资料比较采用成组设计的方差分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 法检测 hsa-miR-137 在 MKN-74、AGS、SGC-7901、MKN-45、BGC-823 及 GES 的表达情况 当 ΔCt 值≤12 时,该细胞中基因表达丰度为高;当 12 < ΔCt 值 < 16 时,该细胞中基因表达丰度为中;当 ΔCt 值≥16 时,该细胞中基因表达丰度为低。hsa-miR-137 在 GES 中的表达丰度为中,在 MKN-74、AGS、SGC-7901、MKN-45、BGC-823 中的表达丰度为低,而在 MKN-45 表达丰度最低,与 GES

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

及其余几种胃癌细胞比较差异有统计学意义(F = 358.00,P < 0.05)。故选择研究 hsa-miR-137 在 MKN-45 细胞中的生物学功能。见图2。

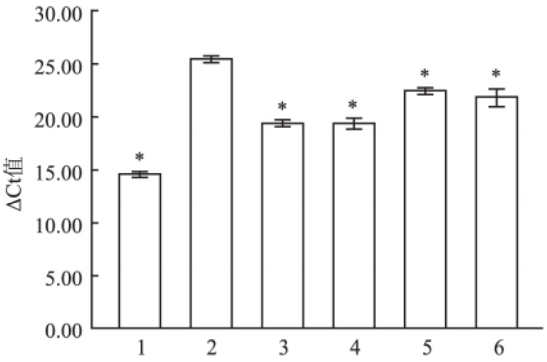

图2 hsa-miR-137 在不同胃癌细胞及人胃上皮细胞的表达

1: GES; 2: MKN-45; 3: SGC-7901; 4: AGS; 5: BGC-823; 6: MKN-74; 与 MKN-45 比较: * P < 0.05

2.2 慢病毒感染 培养生长状态良好的目的细胞,按实验设计的组别加入慢病毒颗粒进行目的细胞的感染实验。感染后荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况。见图3。

2.3 细胞划痕实验检测 miR-137 对胃癌 MKN-45 细胞运动侵袭能力影响 分别计算 CON 组、NC 组、micro up 组3组细胞24、48 h 的迁移率。结果显示,micro up 组24 h 后平均迁移率(0.27),与 CON 组(0.38)和 NC 组(0.37)比较差异有统计学意义(F = 4.44,P < 0.05);micro up 组48 h 后平均迁移率(0.40),与 CON 组(0.53)和 NC 组(0.54)比较差异有统计学意义(F = 6.54,P < 0.05)。结果提示,过表达 miR-137 对 MKN-45 细胞迁移的能力有抑制作用。见图4。

2.4 细胞侵袭小室实验结果 通过对 CON 组、NC 组及 micro up 组进入下室的细胞数量进行测定,检测接种时 MTT OD_{490} 值、侵袭小室 Giemsa 染色 OD_{570} 值及侵袭率。结果显示,micro up 组的平均迁移率(0.548),与 CON 组(0.983)和 NC 组(1.022)比较差异有统计学意义(F = 58.77,P < 0.01)。实验结果显示过表达 miR-137 对于 MKN-45 细胞的迁移能力有抑制作用。见图5。

2.5 Transwell 侵袭实验结果 通过检测 CON 组、NC 组及 micro up 组接种时 MTT OD_{490} 值、Transwell 小室 Giemsa 染色 OD_{570} 及 Transwell 转移率。结果显示micro up 组的平均迁移率(0.250),与 CON 组(0.488)和 NC 组(0.492)比较差异有统计学意义(F = 32.02,P < 0.01)。此结果显示过表达 miR-137 对 MKN-45 细胞迁移的能力有一定抑制作用。见图6。

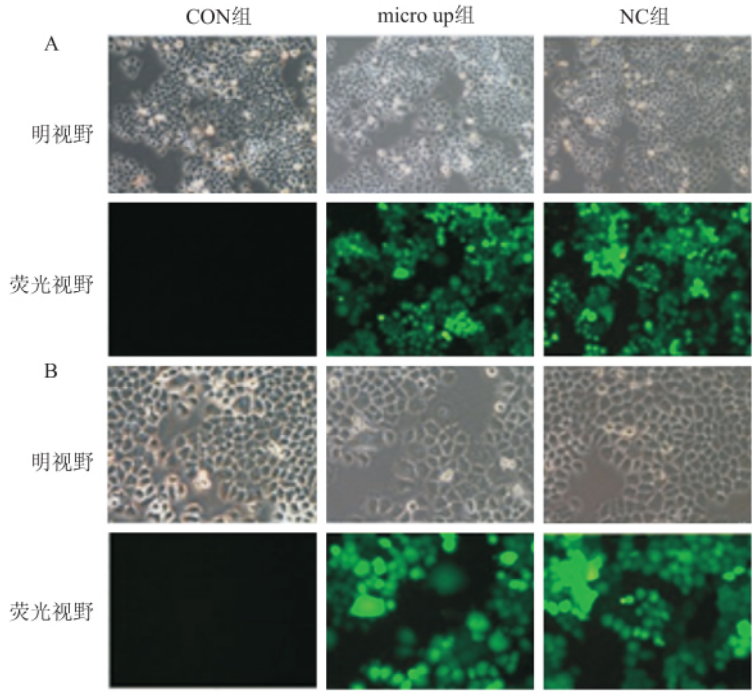

图3 慢病毒感染后细胞图片

A: ×100; B: ×200

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

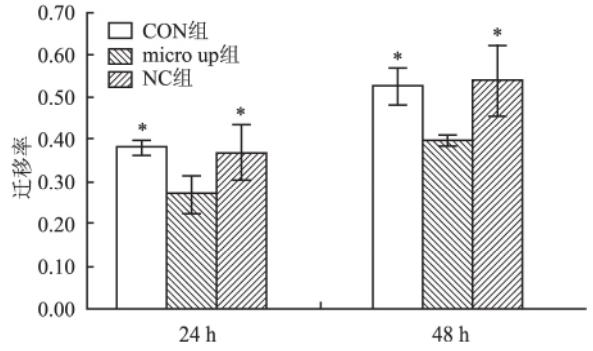

图4 细胞划痕实验检测 miR-137 mimics 对胃癌 MKN-45 细胞迁移能力的影响

与 micro up 组比较: $^{*}P<0.05$

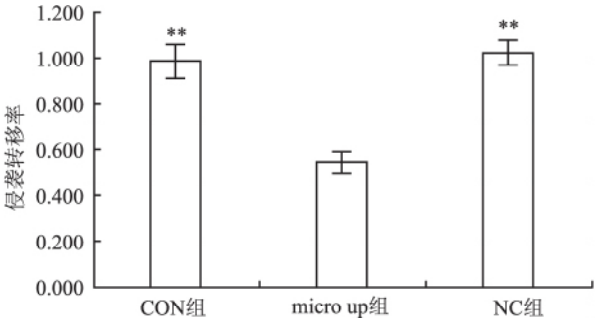

图5 细胞侵袭小室实验检测 miR-137 mimics 对胃癌 MKN-45 细胞侵袭能力影响

与 micro up 组比较: $^{**}P<0.01$

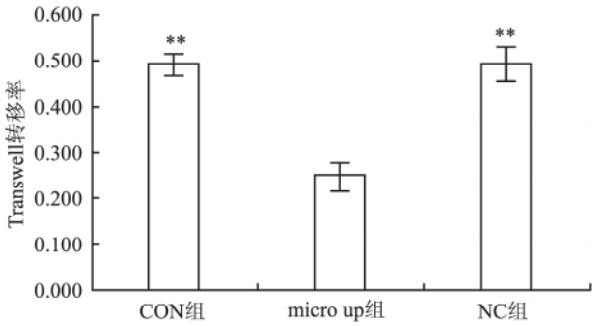

图6 Transwell 侵袭实验检测 miR-137 mimics 对胃癌 MKN-45 细胞侵袭能力影响

与 micro up 组比较: $^{**}P<0.01$

3 讨论

miR 是一类内源性非编码、长度约 22 个核苷酸的小 RNA,参与生命过程发育、分化、增殖及凋亡等重要进程。根据生物学家的统计推测,miR 调节着约 60% 的人类编码基因[3],其中超过 50% 的 miR 基因在功能上与肿瘤的发生发展有着密切的关系[4]。

我国为胃癌的高发国家,通过探讨研究胃癌细胞生物学功能对更深入的阐明胃癌发生发展机制具有着重要的意义。有些 miR 在胃癌中呈低表达,如 miR-182[5] 和 miR-429[6] 等,另外一些 miR 在胃癌中呈高表达,如 miR-130b[7] 和 miR-23a[8] 等。而随着研究的深入,miR 对于胃癌细胞生物学功能的调节作用被进一步揭示,如 miR-146a 在胃癌细胞中高表达,通过下调 SMAD4 基因表达水平促进胃癌细胞生长[9]。miR-145 可抑制胃癌细胞的迁移侵袭[10]。

miR-137 是人类细胞中发现较早,存在很广泛的一种 miR。近期研究显示,miR-137 在很多肿瘤组织中呈低表达,参与调控了肿瘤细胞的多种生物学功能,如 miR-137 可以抑制脑胶质瘤细胞增殖和侵袭[11],与结直肠癌的预后和侵袭密切相关[12],还可以抑制肺癌细胞的增殖[13]。本研究通过 RT-PCR 实验检测 miR-137 在各种胃癌细胞中的表达丰度,结果显示相对于 GES,miR-137 在多种胃癌细胞(MKN-74、AGS、SGC-7901、MKN-45、BGC-823)中呈低表达,差异有统计学意义($P<0.05$)。而 miR-137 在 MKN-45 中表达丰度最低,与各组胃癌细胞比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。miR-137 在多种胃癌细胞中的低表达,提示 miR-137 可能在胃癌的发生发展中发挥着重要作用。为了明确 miR-137 在胃癌转移侵袭中发挥的重要作用,进行了细胞划痕实验、细胞侵袭实验及 Transwell 实验。实验结果显示,在过表达慢病毒感染 miR-137 后,转染的 LV-hsa-miR-137 在划痕实验、细胞侵袭小室实验及 Transwell 侵袭实验中,micro up 组相对于 NC 组和 CON 组,差异均有统计学意义。上述实验结果显示过表达 miR-137 对胃癌 MKN-45 细胞的侵袭迁移能力有抑制作用。

很多文献已验证 miR-137 的靶基因包括 LSD1[14],Cdc42[15] 等,通过在线软件(TargetScan.org、microRNA.org、miRDB.org)预测 miR-137 靶基因显示,miR-137 还有的很多潜在基因如 MMP-2、PTP4A3 等与肿瘤细胞的侵袭及迁移有关。miR-137 可通过对这些靶基因的调控来影响胃癌细胞的相关细胞学功能。

探索 miR-137 如何参与及调控胃癌细胞的各项生物学功能,对于胃癌早期诊断、预后评价及治疗均具有重要意义。本研究结果提示,胃癌细胞中 miR-137 基因的低表达,抑制胃癌细胞的迁移侵袭作用,miR-137 可能成为胃癌诊断的新指标,成为胃癌基

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

因治疗的新靶点。

参考文献

[1] Yang W, Lee D Y, Ben-David Y. The roles of microRNAs in tumorigenesis and angiogenesis [J]. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2011, 3(2): 140 - 55.

[2] Wilmott J S, Zhang X D, Hersey P, et al. The emerging important role of microRNAs in the pathogenesis, diagnosis and treatment of human cancers [J]. Pathology, 2011, 43(6): 657 - 71.

[3] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease [J]. Nat Rev Genet, 2011, 2(12): 861 - 74.

[4] Melo S A, Esteller M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire [J]. FEBS Lett, 2011, 585(13): 2087 - 99.

[5] Kong W Q, Bai R, Liu T, et al. MicroRNA-182 targets cAMP-responsive element-binding protein 1 and suppresses cell growth in human gastric adenocarcinoma [J]. FEBS J, 2012, 279(7): 1252 - 60.

[6] Sun T, Wang C, Xing J, et al. miR-429 modulates the expression of c-myc in human gastric carcinoma cells [J]. Eur J Cancer, 2011, 47(17): 2552 - 9.

[7] Lai K W, Koh K X, Loh M, et al. MicroRNA-130b regulates the tumour suppressor RUNX3 in gastric cancer [J]. Eur J Cancer, 2010, 46(8): 1456 - 63.

[8] Zhu L H, Liu T, Tang H, et al. MicroRNA-23a promotes the growth of gastric adenocarcinoma cell line MGC803 and downregulates interleukin-6 receptor [J]. FEBS J, 2010, 277(18): 3726 - 34.

[9] Xiao B, Zhu E D, Li N, et al. Increased miR-146a in gastric cancer directly targets SMAD4 and is involved in modulating cell proliferation and apoptosis [J]. Oncol Rep, 2012, 27(2): 559 - 66.

[10] Gao P, Xing A Y, Zhou G Y, et al. The molecular mechanism of microRNA-145 to suppress invasion-metastasis cascade in gastric cancer [J]. Oncogene, 2013, 32(4): 491 - 501.

[11] Chen L, Wang X, Wang H, et al. miR-137 is frequently down-regulated in glioblastoma and is a negative regulator of Cox-2 [J]. Eur J Cancer, 2012, 48(16): 3104 - 11.

[12] Chen D L, Wang D S, Wu W J, et al. Overexpression of paxillin induced by miR-137 suppression promotes tumor progression and metastasis in colorectal cancer [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(4): 803 - 11.

[13] Zhu X, Li Y, Shen H, et al. miR-137 inhibits the proliferation of lung cancer cells by targeting Cdc42 and Cdk6 [J]. FEBS Lett, 2013, 587(1): 73 - 81.

[14] Balaguer F, Link A, Lozano J J, et al. Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis [J]. Cancer Research, 2010, 70(16): 6609 - 18.

[15] Liu M, Lang N, Qiu M, et al. miR-137 targets Cdc42 expression, induces cell cycle G1 arrest and inhibits invasion in colorectal cancer cells [J]. Int J Cancer, 2011, 128(6): 1269 - 79.

Effect of microRNA-137 on migration and invasion of MKN-45 cells of human gastric cancer

Liu Xiaoyang[1,2], Zheng Hailun[2], Ren Zhi[2], et al

([1] *Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 233022; [2] *Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu* 233003)

Abstract ***Objective*** To study the effectiveness of over expression of miR-137 on migration and invasion of human gastric cancer MKN-45 cells. ***Methods*** RT-PCR technique was explored to detect the expression of miR-137 of 5 strain of gastric cancer cell and human gastric epithelium. Constructed lentivirus vector of overexpressing miR-137. Scratch test, cell invasion chamber test and Transwell invasive test were used to analyze the effectiveness of overexpression of miR-137 on migration and invasion of human gastric cancer MKN-45 cells. ***Results*** The degree of expression of miR-137 in MKN-45 was obviously lower than those in GES, MKN-74, AGS, SGC-7901 and BGC-823 cells and the difference was significant($P<0.05$). The lentivirus vector of micro up miR-137 infected cells group was successfully built. Scratch test result showed that the average migration rates after 24, 48 h of micro up group compared with CON group and NC group, the difference was significant ($P<0.05$). The results of cell invasion chamber test and Transwell invasive test all showed that the average metastatic rates of micro up group compared with CON group and NC group, the difference was significant ($P<0.01$). ***Conclusion*** Micro up miR-137 could inhibit distinctively the ability of migration and invasion of human MKN-45 cell strain and might be a novel target point for treatment of gastric cancer.

Key words gastric cancer; miR-137; MKN-45; invasion

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net