

miR-365对胃癌SGC-7901细胞的作用及其机制

郑启炜,塔拉,白瑞霞*

(内蒙古自治区人民医院 检验科,内蒙古 呼和浩特 010017)

摘要:目的:探究miR-365对胃癌细胞的作用机制。方法:提取人正常胃黏膜上皮细胞RGM-1和胃癌SGC-7901内的miR-365,通过RT-PCR测定其表达的差异;采用脂质体转染的方法将miR-365转入细胞中。MTT法检测转染后的SGC-7901增殖情况;流式细胞术检测转染后细胞的凋亡情况;Western blotting检测转染48h后p21及Cyclin D1的表达。结果:miR-365的表达显著低于RGM-1细胞($P<0.05$)。转染miR-365 mimics后,miR-365转染组中miR-365表达显著高于空白对照组和阴性对照组。转染2天后,空白对照组中miR-365的OD值显著高于干扰组细胞,差异显著($P<0.05$)。miR-365转染组细胞的凋亡率明显增加($P<0.05$)。转染后的p21蛋白表达量显著升高,而Cyclin D1的表达量显著下降($P<0.05$)。结论:转染miR-365促进细胞凋亡的同时也抑制了胃癌细胞的增殖。

关键词:胃癌; miR-365; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R735.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2021)01-0059-04

胃癌是一种发生在人的胃黏膜上皮细胞中的恶性肿瘤。我国胃癌高发,据统计每年胃癌新增病例接近40万^[1,2]。并且胃癌在我国各种恶性肿瘤中发病率居首位,每年约17万人死于该病。miR-365抑制胃癌细胞的增殖,并普遍参与多种消化道肿瘤的发生、发展^[3]。细胞周期失控、超常运行等情况都会导致癌瘤的发生,如果停滞不前细胞将衰老和凋亡。其中Cyclin D1在细胞从G1期进入S期的过程中发挥着重要作用,也决定着细胞能否能继续的生长与增殖^[4]。p21基因是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族中的一个重要成员^[5]。与肿瘤的抑制作用密切相关^[6]。本研究通过探究miR-365对胃癌细胞的影响,以期新的调控胃癌的发生、发展,具体机制的研究以及治疗来开辟新的思路和途径。

1 材料与方法

1.1 材料

大学病原生物与免疫学研究室惠赠RGM-1细胞和SGC-7901细胞;转染试剂Lipofectamine2000(Invitrogen),实时荧光定量PCR等实验所用试剂均购于大连宝生物工程公司;由上海英潍捷基贸易服务有限公司合成实验所需的质粒表达载体。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RPMI-1640培养基中培养细胞。

1.2.2 实时荧光定量PCR方法检测miR-365的表达 取对数生长期的SGC-7901细胞,提取细胞总RNA设计miR-365及内参基因的PCR引物,以相应的cDNA作为模板,扩增按照实时荧光定量PCR试剂盒说明书进行。

1.2.3 细胞转染 将对数生长期的SGC-7901的细胞收集,随机分为3组:miR-365转染组,阴性对照转染组和空白对照组。转染组中加入3 μ g的miR-365 mimics和300 μ L脂质体。将质粒和脂质体分混合均匀后加入培养基中。培养了48h后,将3组的对数生长期细胞分别收集好后,每组细胞中miR-365的表达采用RT-PCR方法检测,观察其转染效果。

1.2.4 MTT法绘制生长曲线 取三组细胞,每组接种6个孔,于96孔板。培养24h以后,再分别于第1、2、3、4、5天的时候在每个复孔中分别加入20 μ L 50mg/mL的MTT液体,继续培养24h后,检测各组细胞的光吸收值(A值),时间为x轴,A值为y轴,绘制出胃癌SGC-7901细胞生长曲线(酶联仪570nm波长条件下检测)。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 上流式细胞仪检测稳定转染48h后的三组细胞,分别检测每组的凋

收稿日期:2020-09-30;修回日期:2020-12-13

作者简介:郑启炜(1985-),男,内蒙古自治区人民医院检验科主管检验师。

通讯作者:白瑞霞,主任检验师,E-mail:yxybrx@126.com 内蒙古自治区人民医院检验科,010017

亡率。

1.2.6 Western blotting 检测蛋白 收集转染 48 h 后三组细胞,提取蛋白。12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳。转移到 NC 膜,用 5% 脱脂奶粉封闭,然后加入一抗(1:800),放置于 4 °C 冰箱过夜。第二天取出并加入对应的 1:3 000 的碱性磷酸酶标记的二抗(羊抗兔 IgG),室温放置反应 1 h。最后电化学发光显色拍照。

1.3 统计学处理

用 SPSS 20.0 的统计学分析软件对实验数据进行统计学分析,两组时为 t 检验,多组时为单因素方

差分析。结果以平均数 ± 标准差表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-365 的表达及其转染效果

胃癌 SGC-7901 细胞中 miR-365 的表达水平显著低于 RGM-1 细胞 ($P < 0.05$) (见表 1)。转染组中 miR-365 表达较阴性对照组和空白对照组均有显著升高 ($P < 0.05$), 阴性对照组与空白对照组 miR-365 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 2)。

表 1 RGM-1 细胞和 SGC-7901 细胞 miR-365 的表达水平

细胞	胃黏膜上皮 RGM-1 细胞	胃癌 SGC-7901 细胞
miR-365 的相对表达水平	0.754 ± 0.07	0.371 ± 0.03*

注: *两组细胞比较, ($P < 0.05$)。

表 2 miR-365 的表达水平

细胞组	转染组	阴性对照组	空白对照组
miR-365 的相对表达水平	4.78 ± 0.96	1.21 ± 0.35*	1.13 ± 0.29#

注: *阴性对照组与转染组比较, ($P < 0.05$)。#空白对照组与转染组比较, ($P < 0.05$)。

2.2 miR-365 对胃癌 SGC-7901 细胞增殖的作用

miR-365 转染组的细胞生长速度从第三天开始变慢, 明显低于阴性对照转染组和空白对照组的生长速度 ($P < 0.05$); 而阴性对照转染组与空白对照组的生长速度相比没有明显差异 ($P > 0.05$) (见图 1)。

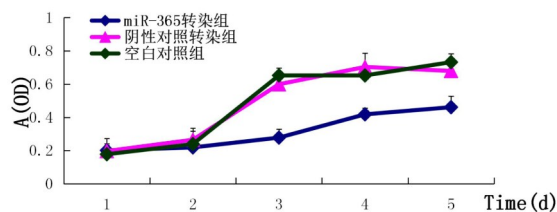


图 1 细胞生长曲线

2.3 miR-365 对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的影响

miR-365 对胃癌 SGC-7901 细胞的凋亡是有促

进作用(见表 3, 图 2)。

表 3 转染组、阴性对照组、空白对照组的凋亡率

细胞组	转染组	阴性对照组	空白对照组
细胞凋亡率	(43.51 ± 3.43)%	(6.75 ± 2.62)%*	(7.99 ± 2.38)%**

注: *阴性对照组与转染组比较, ($P < 0.05$)。#空白对照组与转染组比较, ($P < 0.05$)。**空白对照组与阴性对照组比较, ($P > 0.05$)。

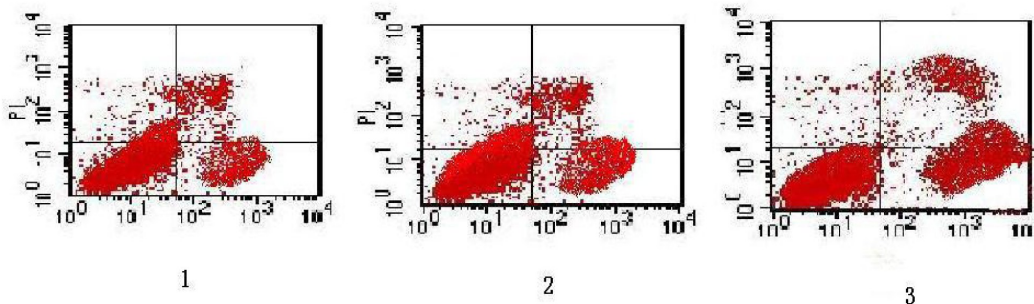


图 2 miR-365 对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的作用

1. 空白对照组细胞; 2. 阴性对照组细胞; 3. miR-365 转染 48h 后 SGC-7901 细胞

2.4 miR-365对胃癌SGC-7901细胞p21、Cyclin D1蛋白表达的影响

用Western blotting的方法检测p21蛋白和Cyclin D1蛋白的表达。

$$\text{每一条带的蛋白含量} = \frac{\text{此条带的吸光度值} \times \text{对应条带的面积}}{\text{同一样本的GAPDH(内参)条带的吸光度值} \times \text{条带的面积}}。$$

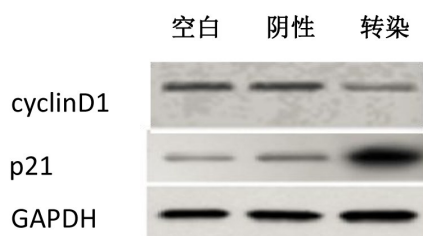


图3 Cyclin D1、p21的western blot结果

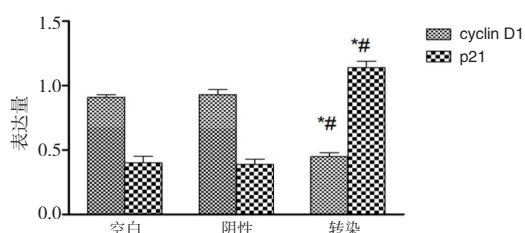


图4 Cyclin D1、p21蛋白表达量

3 讨论

MicroRNAs是近年来发现并研究较热的一类很重要的基因调节分子。有研究表明在一些恶性肿瘤中,有些microRNAs表达与相应癌旁对照存在明显不同,另外microRNAs在生物体的发育、肿瘤的发生等生理及病理过程中发挥着某些重要的作用。很多研究结果显示肿瘤患者的预后与microRNAs的表达水平有一定关系。这就提示我们,寻找那些在肿瘤中发挥作用的microRNAs并研究它们的作用机制,可为microRNAs在肿瘤中的作用的研究提供新的思路,同时也为其在肿瘤的诊断和治疗方面进一步开拓思路^[6-8]。

Cyclin参与调控细胞周期的进程。CyclinD1的蛋白分子量接近34KD,是与细胞周期关系密切的一个关键性的基因,除了主要参与调控细胞G1期限制点,同时也是参与调控细胞增殖,其在细胞从G1期进入S期的过程中发挥着关键作用,甚至决定着细胞能否继续增殖与生长。CyclinD1的表达异常会引起的细胞周期的失控进而会导致细胞异常增殖并癌变^[9]。有研究证明CyclinD1与肿瘤的发生、发

实验结果显示转染48h的Cyclin D1蛋白表达量显著降低,而p21蛋白表达量较空白组相比显著升高($P < 0.05$)(见图3、4)。

展关系密切,因此,近些年里有大量研究CyclinD1在乳腺癌、胃癌等癌细胞中的作用^[4]。

胃癌的发生过程是一个极其复杂的,癌细胞的细胞凋亡受阻、恶性增殖及具体的作用机制等都有待进一步研究^[10]。miR-365在多种肿瘤组织中表达下调。本研究发现,miR-365在胃癌SGC-7901细胞中呈低表达,通过转染的方法,表明miR-365表达能够明显,促进细胞的凋亡,同时使细胞凋亡的重要调控成员Cyclin D1表达下调,p21蛋白的表达上调,提示miR-365可能通过下调cyclin D1和上调p21蛋白的表达来抑制胃癌细胞的增殖^[9, 11, 12]。本研究结果或可作为胃癌的早期筛查以及胃癌的治疗潜在的靶分子,并为下一步的临床研究奠定基础。也希望后期有更多实验多方来论证。

参考文献

- [1]HE Y, CAO X, KONG Y, et al. Apoptosis-promoting and migration-suppressing effect of alantolactone on gastric cancer cell lines BGC-823 and SGC-7901 via regulating p38MAPK and NF-kappaB pathways [J]. Hum Exp Toxicol, 2019; 38 (10): 1132-1144
- [2]ZHENG P, WANG W, JI M, et al. TMEM119 silencing inhibits cell viability and causes the apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells [J]. Oncol Lett, 2018; 15(6): 8281-8286
- [3]BELLON A, IYER A, BRIDI S, et al. miR-182 Regulates Slit2-Mediated Axon Guidance by Modulating the Local Translation of a Specific mRNA [J]. Cell Rep, 2017; 18(5): 1171-1186
- [4]SUN F, LI N, TONG X, et al. Ara-c induces cell cycle G1/S arrest by inducing upregulation of the INK4 family gene or directly inhibiting the formation of the cell cycle-dependent complex CDK4/cyclin D1 [J]. Cell Cycle, 2019; 18 (18): 2293-2306
- [5]MORIYAMA K, HORI T. BCR-ABL induces tyrosine phosphorylation of YAP leading to expression of Survivin and Cyclin D1 in chronic myeloid leukemia cells [J]. International Journal of Hematology, 2019; 110(5):591-598

(下转第68页)

2018 ;20(7):572-577

[12] Ichikawa G, Watabe Y, Suzumura H, et al. Hypophosphatemia in small for gestational age extremely low birth weight infants receiving parenteral nutrition in the first week after birth[J]. J Pediatr Endocrinol Metab. 2012;25(3-4):317-21

[13] Hammerman C, Bin ~ Nun A, Markovitch E, et al. Ductal closure with paracetamol: a surprising new approach to patent

ductus arteriosus treatment[J]. Pediatrics, 2011;128:1618-1612

[14] 胥焕, 杨春燕, 许平. 出生体重 < 1 500 g 早产儿静脉营养疗效及并发症观察[J]. 中华危重病急救医学, 2019;31(11):1395-1400

[15] 徐佳慧, 富建华. 超早产儿远期预后的研究进展[J]. 中华新生儿科杂志, 2019;34(6):469-472

(上接第 29 页)

[12] 丁明明, 陈文莉, 戴益辉, 等. 简述中药热奄包的临床应用近况[J]. 江西中医药, 2019;50(08):72-74

[13] 王彬, 张盼盼, 曹向可, 等. 补充益生菌对喘息性支气管炎患儿免疫和微生态变化的影响[J]. 中国综合临床, 2018;34(02):109-114

[14] 陈宏, 张伟, 苏玉明, 等. 补益肺肾法治疗对变应性哮喘患

儿 IFN- γ 、IL-4 和 IL-13 的影响[J]. 天津中医药, 2020;37(02):193-195

[15] Yun-Soo Seo, Hyo Seon Kim, A. Yeong Lee, et al. *Codonopsis lanceolata* attenuates allergic lung inflammation by inhibiting Th2 cell activation and augmenting mitochondrial ROS dismutase (SOD2) expression. 2019;9(Z5):829-837

(上接第 61 页)

[6] LIU H, WU H, QIN X. MicroRNA-206 serves as a tumor suppressor in pediatric acute myeloid leukemia by targeting Cyclin D1 [J]. Pathol Res Pract, 2019;215(10):152554

[7] GUPTA P, SATA T N, AHAMAD N, et al. Augmenter of liver regeneration enhances cell proliferation through the microRNA A-26a/Akt/cyclin D1 pathway in hepatic cells[J]. Hepatol Res, 2019;49(11):1341-1352

[8] YUDHANI R D, ASTUTI I, MUSTOFA M, et al. Metformin Modulates Cyclin D1 and P53 Expression to Inhibit Cell Proliferation and to Induce Apoptosis in Cervical Cancer Cell Lines [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2019;20(6):1667-1673

[9] OU W B, NI N, ZUO R, et al. Cyclin D1 is a mediator of gastrointestinal stromal tumor KIT-independence [J]. Oncogene, 2019;38(39):6615-6629

[10] CHENG Y, LI N, EAPEN A, et al. Somatic BRCA2 Mutation

-Positive Concurrent Accessory Male Breast Cancer (BC) and Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Excellent Efficacy of Palbociclib, Fulvestrant and Leuprolide in Platinum-Exposed and Endocrine-Refractory BC Associated with Cyclin D1 and FGFR1 Amplification and of Carboplatin, Paclitaxel and Radiation in NSCLC [J]. Case Rep Oncol, 2019;12(2):494-499

[11] MONTALTO F I, GIORDANO F, CHIODO C, et al. Progesterone Receptor B signaling Reduces Breast Cancer Cell Aggressiveness: Role of Cyclin-D1/Cdk4 Mediating Paxillin Phosphorylation [J]. Cancers (Basel), 2019;11(8):1201

[12] HOU A, ZHANG Y, ZHENG Y, et al. LncRNA terminal differentiation-induced ncRNA (TINCR) sponges miR-302 to upregulate cyclin D1 in cervical squamous cell carcinoma (CSCC) [J]. Hum Cell, 2019;32(4):515-521