

miR-505-3p 对胃癌细胞增殖、克隆形成及迁移、侵袭的影响及机制研究

张金刚^a, 齐普良^a, 吴刚^b, 郭厚乐^c, 王磊^d

(青海省人民医院 a. 急诊外科; b. 普外科; c. 肿瘤外科; d. 病理科, 西宁 810000)

摘要: **目的** 检测胃癌组织及细胞中 miR-505-3p 表达, 并探究其对胃癌细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭的影响及潜在分子机制。**方法** 利用实时荧光定量 PCR 实验 (qRT-PCR) 检测胃癌组织、癌旁正常组织及胃癌细胞和人正常胃黏膜细胞中 miR-505-3p 相对表达; 构建 miR-505-3p 过表达、c-MYC 过表达和敲低表达细胞系, 通过 CCK-8 法, 克隆斑点形成实验、Transwell 侵袭/迁移实验检测 miR-505-3p 和 c-MYC 对胃癌细胞增殖、克隆形成及迁移、侵袭的影响; 裸鼠皮下成瘤实验验证 miR-505-3p 对裸鼠肿瘤生长的影响; 双荧光素报告实验验证 miR-505-3p 和 c-MYC 的靶向关系, 并探究其两者间的表达调控作用; Western blot 检测 miR-505-3p 和 c-MYC 对 Wnt/ β -catenin 通路关键蛋白表达的影响。**结果** 临床胃癌组织中 miR-505-3p 表达水平较正常癌旁组织显著下调 (0.92 ± 0.37 vs 1.74 ± 0.59), 差异有统计学意义 ($t=3.723, P < 0.01$)。胃癌细胞系 MGC803 (1.12 ± 0.35), AZ521 (2.31 ± 0.24) 和 HGC-27 (2.28 ± 0.43) 中 miR-505-3p 相对表达较人正常胃黏膜细胞系 GES1 (4.62 ± 0.79) 明显降低, 差异有统计学意义 ($F=26.109, P < 0.001$)。miR-505-3p 过表达组细胞增殖 (0.92 ± 0.27)、克隆形成 (51.67 ± 21.75)、迁移 (43.25 ± 15.47)、侵袭 (38.53 ± 14.76) 能力较 NC 组 ($1.85 \pm 0.34, 128.36 \pm 36.42, 100.08 \pm 2.12, 100.12 \pm 1.94$) 明显降低, 差异均有统计学意义 ($t=3.131 \sim 7.166$, 均 $P < 0.05$); miR-505-3p 过表达抑制了裸鼠生长。c-MYC 是 miR-505-3p 的靶基因, miR-505-3p 靶向负调控 c-MYC。c-MYC 过表达组细胞增殖 (2.72 ± 0.68)、迁移 (147.15 ± 20.36)、侵袭 (145.46 ± 22.73) 能力较 NC 组 ($1.85 \pm 0.34, 100.08 \pm 2.12, 100.12 \pm 1.94$) 明显增高, 差异均有统计学意义 ($t=2.455 \sim 4.456$, 均 $P < 0.05$); c-MYC 过表达可逆转 miR-505-3p 对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。miR-505-3p 过表达组 Wnt (0.46 ± 0.07), β -catenin (0.50 ± 0.05) 蛋白相对表达水平明显低于 NC 组 ($1.01 \pm 0.02, 1.02 \pm 0.02$), 差异均有统计学意义 ($t=8.139, 7.342$, 均 $P < 0.001$); 过表达 c-MYC 能够逆转 miR-505-3p 对 Wnt 和 β -catenin 蛋白表达的抑制作用。**结论** 胃癌中 miR-505-3p 显著低表达, 其可通过靶向调控 c-MYC 表达介导 Wnt/ β -catenin 信号通路激活进而发挥作用参与胃癌的发生发展过程。

关键词: 胃癌; 微小核糖核酸 -505-3p; c-MYC; 增殖; 克隆形成; 迁移; 侵袭

中图分类号: R735.2; R730.4 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 04-069-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.04.014

Effect and Mechanism of miR-505-3p on Proliferation, Clone Formation, Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells

ZHANG Jin-gang^a, QI Pu-liang^a, WU Gang^b, GUO Hou-le^c, WANG Lei^d

(a. Department of Emergency Surgery; b. Department of General Surgery; c. Department of Surgical Oncology; d. Department of Pathology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810000, China)

Abstract: Objective The expression of miR-505-3p in gastric cancer tissues and cells was detected, and its effect on proliferation, clonogenesis, migration and invasion of gastric cancer cells and its potential molecular mechanism were explored.

Methods QRT-PCR was used to detect the relative expression of miR-505-3p in gastric cancer tissues, normal adjacent tissues, gastric cancer cells and human normal gastric mucosa cells. MiR-505-3p overexpression, c-MYC overexpression and knockdown expression cell lines were constructed, and the effects of miR-505-3p and c-MYC on proliferation, clonal formation, migration and invasion of gastric cancer cells were detected by CCK-8 assay, clone spot formation assay and Transwell invasion/migration assay. The effect of miR-505-3p on tumor growth in nude mice was detected by subcutaneous tumorigenesis assay. Dual fluorescein reporting assay was used to verify the targeting relationship between miR-505-3p and c-MYC, and explored the expression regulation between the two. Western blot was used to detect the effects of miR-505-3p and c-MYC on the expression

基金项目: 青海省 2018 年医药卫生科技项目课题 (指导性项目) (No.Y2018-21)。

作者简介: 张金刚 (1980-), 男, 本科, 主治医师, 急诊外科, 研究方向: 胰腺肿瘤, E-mail: zjgyou@126.com。

通讯作者: 齐普良 (1987-), 男, 硕士, 主治医师, 急诊外科, 研究方向: 胰腺肿瘤, E-mail: qipuliang@163.com。

of key proteins in the Wnt/ β -catenin pathway. **Results** The expression level of miR-505-3p in gastric cancer tissues was significantly down-regulated compared with normal adjacent tissues (0.92 ± 0.37 vs 1.74 ± 0.59), the difference was statistically significant ($t=3.723, P < 0.01$). The relative expression of miR-505-3p in gastric cancer cell line MGC803 (1.12 ± 0.35), AZ521 (2.31 ± 0.24), and HGC-27 (2.28 ± 0.43) was significantly lower than that in human normal gastric mucosa cell line GES1 (4.62 ± 0.79), the differences was statistically significant ($F=26.109, P < 0.001$). MiR-505-3p overexpression group showed proliferation (0.92 ± 0.27), clonal formation (51.67 ± 21.75), migration (43.25 ± 15.47) and invasion ability (38.53 ± 14.76) were significantly decreased compared with NC group ($1.85 \pm 0.34, 128.36 \pm 36.42, 100.08 \pm 2.12, 100.12 \pm 1.94$), the differences were statistically significant ($t=3.131 \sim 7.166, \text{all } P < 0.05$). MiR-505-3p overexpression inhibited the growth of nude mice. C-MYC was the target gene of miR-505-3p, and miR-505-3p negatively regulates c-MYC. C-MYC overexpression group showed proliferation (2.72 ± 0.68), migration (147.15 ± 20.36) and invasion (145.46 ± 22.73) compared with NC group ($1.85 \pm 0.34, 100.08 \pm 2.12, 100.12 \pm 1.94$), the differences were statistically significant ($t=2.455 \sim 4.456, \text{all } P < 0.05$). c-MYC overexpression can reverse the inhibitory effect of miR-505-3p on proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells. The relative expression levels of Wnt (0.46 ± 0.07) and β -catenin (0.50 ± 0.05) in miR-505-3p overexpression group were significantly lower than those in NC group ($1.01 \pm 0.02, 1.02 \pm 0.02$), the differences were statistically significant ($t=8.139, 7.342, \text{all } P < 0.001$). Overexpression of c-MYC could reverse the inhibitory effect of miR-505-3p on the expression of Wnt and β -catenin proteins. **Conclusion** MiR-505-3p was significantly underexpressed in gastric cancer, which plays a role in the occurrence and development of gastric cancer through the targeted regulation of c-MYC expression mediating the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Keywords: gastric cancer; miR-505-3p; c-MYC; proliferation; clone formation; migration; invasion

胃癌是世界范围内常见的恶性肿瘤,在全球恶性肿瘤死亡率中排名第二,其恶性程度高,早期症状隐匿,大部分患者入院就诊时已为中晚期,临床预后明显不良^[1]。近年随着对胃癌发病机制的深入研究,人们发现胃癌的发生发展涉及大量致癌基因和抑癌基因的改变,基于分子靶标机制的探究已成为目前癌症研究的热点^[2]。因此,积极探寻更多胃癌生物分子靶标及其相关作用机制对胃癌临床诊治具有重要积极意义。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是近年研究发现的一种小的非编码RNA分子,其可在转录后水平调控靶基因的表达^[3]。据报道,miRNAs在人类癌症中经常处于失调状态,通过发挥致癌或抑癌基因作用参与人类多种恶性肿瘤的生物过程,例如细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡、耐药等,被证实是许多疾病和癌症的潜在分子标记物^[4-5]。miR-505-3p是近年新发现的miRNA分子,研究证实其在肿瘤组织及细胞中异常低表达,上调miR-505-3p可明显抑制脑胶质瘤、胰腺癌、前列腺癌等的增殖及侵袭,扮演抑癌基因角色^[6-8]。然其在胃癌中的作用尚不清楚,因此本研究拟探究miR-505-3p在胃癌组织及细胞中的表达及其对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响及潜在作用机制,以期为临床胃癌的研究攻克提供更多分子靶标。

1 材料与方法

1.1 研究对象 胃癌细胞系MGC803, AZ521, HGC-27和人正常胃黏膜细胞GES1由中国科学院提供,37℃,5ml/dl CO₂条件下在含10g/dl胎牛血清的DMEM培养液中培养。选取2021年1月~3

月青海省人民医院病理科留存的10例胃癌患者的癌组织及对应癌旁正常组织样本进行研究,患者均在本院就诊,组织标本经病理确诊后-80℃保存于低温液氮中;患者术前未接受任何相关放化疗及新辅助治疗,未并发其他恶性肿瘤。4周龄C57雌性裸鼠购自上海吉辉生物科技有限公司。研究获得医院医学伦理委员会批准,患者均知情同意。

1.2 试剂及仪器 DMEM培养液,胎牛血清, Lip2000转染试剂(美国Gibco公司); CCK-8试剂盒(碧云天); 酶标仪(美国Bio-rad公司); TRIzol试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 逆转录试剂盒(Aidlab, Beijing, China); 7500 Fast Real-Time PCR仪(美国ABI公司); Transwell小室(BD Biosciences, Bedford, MA, USA); 双荧光素酶报告检测系统(Promega, Mannheim, Germany); 光度计(Molecular Devices, U.S.A.); miR-NC阴性对照, miR-505-3p mimic模拟物, pcDNA3.1空载体, pcDNA3.1-c-MYC过表达载体, 干扰si-c-MYC序列(上海吉玛基因生物); c-MYC-3'UTR-wt野生型和3'UTR-mut突变型荧光质粒(南京科佰生物科技有限公司设计合成)。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染及分组: 取待测胃癌细胞生长到85%左右时参照Lipo2000转染说明书操作进行细胞转染,37℃,5ml/dl CO₂培养48h,收集细胞进行实验。分组: NC(转染miR-NC的miR-505-3p阴性对照组), miR-505-3p过表达组(转染miR-505-3p mimic模拟物组), Vector组(转染pcDNA3.1-Vector载体

的 c-MYC 空白对照组), c-MYC 过表达组(转染 pcDNA3.1-c-MYC 过表达载体组), c-MYC 敲低组(转染干扰 si-c-MYC 序列组), 共转染 miR-505-3p 过表达 +c-MYC 过表达组。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 实验(qRT-PCR): 利用 TRIzol 试剂提取细胞及组织中总 RNA, 通过逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA, 并以此为模板配置 PCR 反应体系, 利用 7500 Fast Real-Time PCR 仪进行 qRT-PCR; 反应条件: 95 °C 30s, 95 °C 15 s, 72 °C 10s, 循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达。引物如下: c-MYC: 正向 5'-TGAGGAGA CACCGCCAC-3', 反向 5'-CAACATCGATTCTTC CTCATCTTC-3'; miR-505-3p: 正向 5'-CTACGTGG GTCACCCCTC-3', 反向 5'-CCAAAGGAGACCTC GTAGT-3'; GAPDH: 正向 5'-TGTCGTCATGGGTG TGAAC-3', 反向 5'-ATGGCATGGACTGTGGTCA T-3'。

1.3.3 CCK-8 细胞增殖实验: 取转染后各组细胞以 1×10^4 孔接种到 96 孔板, 每孔设 3 个复孔, 37 °C, 5ml/dl CO₂ 孵育 48h 后每孔加入含 10g/dl CCK-8 试剂的 DMEM 培养液继续孵育 0, 24, 48, 72 h, 酶标仪在 450 nm 处测量吸光度值(A 值), 绘制增殖曲线, 实验重复 3 次取平均值。

1.3.4 克隆斑点形成实验: 取对数生长期各组细胞, 胰酶消化, 以每孔 200 个细胞铺于 6 孔板, 每孔设 3 个复孔, 37 °C, 5ml/dl CO₂ 培养至出现肉眼可见的克隆时收集细胞, 加入 4g/dl 多聚甲醛固定 20 min, 0.1g/dl 结晶紫染色 30 min, 观察拍照分析。

1.3.5 裸鼠成瘤实验: 取对数生长期细胞胰酶消化, PBS 清洗 2 次, 用无血清培养液吹打细胞沉淀制成细胞悬液, 浓度 1×10^7 /ml, 接种到裸鼠皮下, 每周 2 次利用游标卡尺测量肿瘤最长最短部位, 第 30 天处死小鼠, 取肿瘤组织进行称重。

1.3.6 Transwell 侵袭、迁移实验: 采用 Transwell 小室, 根据试验说明书操作进行检测。迁移检测: 用无血清 DMEM 培养液重悬细胞, 浓度 1×10^6 /ml, 在小室上室加入细胞悬液, 下室加入 600 μ l 含 10g/dl 胎牛血清的 DMEM 完全培养液, 培养 24 h; 取出小室, 吸干上室培养液, 4g/dl 多聚甲醛固定 30 min, 0.05g/dl 结晶紫染色 30 min, 湿棉签擦除上室多余细胞, 晾干, 倒置光学显微镜下观察并计数。侵袭检测: Transwell 小室上室底部中央铺上 Matrigel 基质胶, 下室加入 600 μ l 含 10g/dl 胎牛血清的 DMEM 完全培养液, 上室加入细胞悬液, 其余操作同细胞迁移检测。

1.3.7 蛋白免疫印迹实验: 取转染后各组细胞加入细胞裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度;

取蛋白样品, SDS-PAGE 电泳分离, 待蓝色条带跑出即进行电转, 100 V 电转 2 h, 转移到 PVDF 膜, 5g/dl 脱脂奶粉封闭 1 h, PBST 洗膜 2 次, 加入一抗孵育过夜; 次日 PBS 清洗 2 次, 加入二抗室温孵育 2 h, PBS 清洗 3 次, 化学发光法进行显色, 凝胶成像仪观察拍照, Image-J 软件进行灰度分析。

1.3.8 双荧光素酶报告基因实验: 取对数生长期各组细胞接种到 6 孔板, 将包含 miR-505-3p 结合位点在的含有海肾荧光素酶报道质粒的 c-MYC 野生型和突变型荧光质粒转染至待测细胞中, 使用荧光素酶测定系统测量各组细胞荧光素酶活性, 实验重复 3 次取平均值。

1.3.9 生物信息学分析: 利用 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 网站预测 miR-505-3p 可能的靶基因, 并验证两者的结合关系。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计分析, 实验数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验; 癌组织及癌旁组织差异比较采用配对 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织及细胞中 miR-505-3p 表达 qRT-PCR 检测显示, 相对正常癌旁组织 (1.74 ± 0.59), 10 例临床胃癌组织 (0.92 ± 0.37) 中 miR-505-3p 表达水平显著下调, 差异有统计学意义 ($t=3.723$, $P < 0.01$); 同时胃癌细胞系 MGC803 (1.12 ± 0.35), AZ521 (2.31 ± 0.24), HGC-27 (2.28 ± 0.43) 中 miR-505-3p 相对表达均较人正常胃黏膜细胞系 GES1 (4.62 ± 0.79) 明显降低, 差异有统计学意义 ($F=26.109$, $P < 0.001$), MGC803 细胞系降低最显著, 故选择该细胞用于后续实验。

2.2 miR-505-3p 表达对胃癌增殖、克隆形成及迁移、侵袭的影响 见表 1。qRT-PCR 检测发现, miR-505-3p 过表达组 (4.91 ± 0.68) 细胞中 miR-505-3p 相对表达量较 NC 组 (1.86 ± 0.93) 显著上调, 差异有统计学意义 ($t=4.586$, $P < 0.01$), 表明 miR-505-3p 过表达细胞系构建成功。CCK-8 法检测显示, 转染 72 h 后 miR-505-3p 过表达组细胞增殖能力较 NC 组明显降低 ($P < 0.05$); 克隆形成实验证实, miR-505-3p 过表达组细胞克隆形成数目较 NC 组明显降低 ($P < 0.05$); Transwell 实验检测显示, miR-505-3p 过表达组细胞迁移、侵袭数目均较 NC 组明显降低 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义。见图 1, 体内裸鼠成瘤实验证实, miR-505-3p 过表达抑制了肿瘤生长(图 1A), 包括对肿瘤体积(图 1B)和重量(图 1C)的抑制。提示 miR-505-3p 过表达能明显抑制胃

癌细胞的增殖、克隆形成及迁移、侵袭,其在胃癌发生发展中扮演抑癌基因。

表1 miR-505-3p 过表达对胃癌细胞增殖、克隆形成及迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

类别	NC组	miR-505-3p 过表达组	<i>t</i>	<i>P</i>
增殖A值	1.85 ± 0.34	0.92 ± 0.27	3.710	<0.05
克隆形成数目(个)	128.36 ± 36.42	51.67 ± 21.75	3.131	<0.05
细胞迁移数目(个)	100.08 ± 2.12	43.25 ± 15.47	6.304	<0.01
细胞侵袭数目(个)	100.12 ± 1.94	38.53 ± 14.76	7.166	<0.01

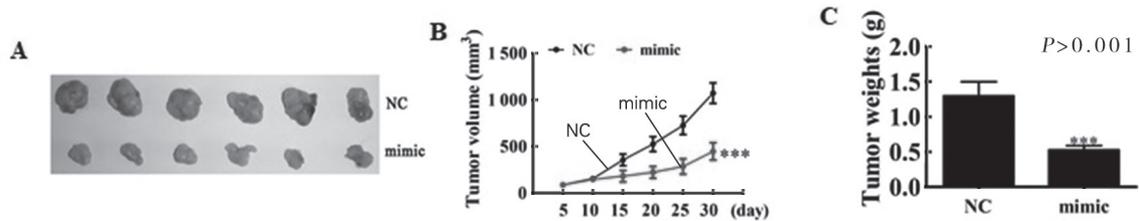
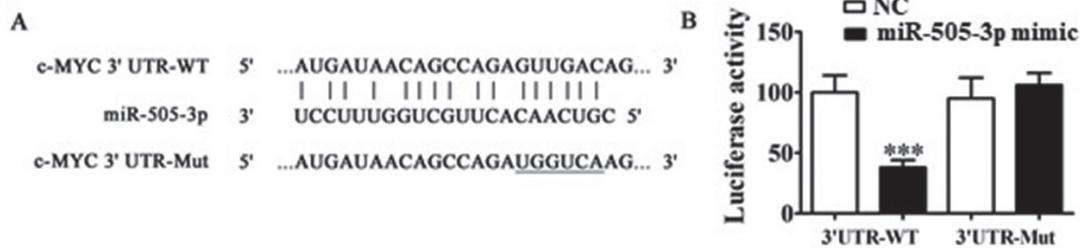


图1 体内裸鼠成瘤实验检测 miR-505-3p 对肿瘤生长(体积和重量)的影响

2.3 miR-505-3p 与 c-MYC 靶向关系验证 见图2。经检索生物信息学数据库发现,miR-505-3p 与 c-MYC 的 3'UTR 区存在特异性结合位点,推测 c-MYC 可能是 miR-505-3p 的下游靶点(图 2A)。研究通过构建包含有 miR-505-3p 结合位点的 c-MYC 3'UTR-WT 野生型和 3'UTR-Mut 突变型荧光素酶报告载体,并与 miR-505-3p 过表达 mimic 片段共转染到 MGC803 细胞中,经双荧光素酶报告基因实验证实,转染 miR-505-3p 过表达明显降低了 c-MYC-3'UTR-WT 型荧光素酶活力 ($P < 0.001$),

而对 c-MYC-3'UTR-Mut 型荧光素酶活力无明显影响 ($P > 0.05$) (图 2B),说明 c-MYC 和 miR-505-3p 之间存在靶向作用关系, c-MYC 是 miR-505-3p 的潜在靶基因。

见表 2。qRT-PCR 检测发现, c-MYC 过表达对 miR-505-3p 表达无明显影响 ($P > 0.05$); miR-505-3p 过表达明显抑制了 c-MYC 表达 ($P < 0.01$), 共转染 c-MYC 过表达载体后恢复并促进了 c-MYC 表达 ($P < 0.001$)。说明 miR-505-3p 靶向负调控 c-MYC 表达。



A. 数据库检索 miR-505-3p 和 c-MYC 间存在靶向结合位点; B. 荧光素酶报告实验验证 miR-505-3p 和 c-MYC 的靶向关系,与 NC 组相比, *** $P < 0.001$ 。

图2 荧光素酶报告实验验证 miR-505-3p 和 c-MYC 的靶向关系

表2 miR-505-3p 与 c-MYC 间的表达调控关系 ($\bar{x} \pm s$)

基因表达	NC组 ^①	miR-505-3p 过表达组 ^②	miR-505-3p 过表达 + c-MYC 过表达组 ^③	<i>F</i>	<i>p</i>
miR-505-3p	1.02 ± 0.03	4.13 ± 0.76	4.06 ± 0.69	26.909	<0.001
c-MYC	1.01 ± 0.02	0.23 ± 0.04	2.46 ± 0.45	56.360	<0.001

注: ①与②比较, $t=6.427, 3.659$, 均 $P < 0.005$ 。①与③比较, $t=6.282, 6.802$, 均 $P < 0.005$ 。②与③比较, $t_{c-MYC}=10.461, P < 0.001$ 。

2.4 miR-505-3p 调控 c-MYC 对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响 见表 3。qRT-PCR 检测显示, c-MYC 过表达组 (2.59 ± 0.67) 细胞中 c-MYC 表达较 Vector 组 (1.02 ± 0.01) 明显增高, 差异有统计学意义 ($t=4.058, P < 0.05$); c-MYC 敲低表达组 (0.31 ± 0.02) 细胞中 c-MYC 表达较 Vector

组 (1.02 ± 0.01) 明显降低, 差异有统计学意义 ($t=54.996, P < 0.001$), 说明过表达 / 敲低 c-MYC 表达细胞系稳转成功。细胞实验检测显示, c-MYC 过表达组细胞增殖、迁移及侵袭能力较 NC 组明显升高 ($P < 0.01$), 共转染 c-MYC 过表达逆转了 miR-505-3p 对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作

用, 其水平恢复基本接近正常, 表明 miR-505-3p 生物学行为。可通过靶向负调控 c-MYC 表达参与胃癌细胞的生

表 3 miR-505-3p 调控 c-MYC 对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

类别	NC 组 ^①	miR-505-3p 过表达组 ^②	c-MYC 过表达组 ^③	miR-505-3p 过表达 + c-MYC 过表达组 ^④	F	P
细胞增殖 A 值	1.85 ± 0.34	0.92 ± 0.27	2.72 ± 0.68	1.76 ± 0.32	8.625	<0.05
细胞迁移数目 (个)	100.08 ± 2.12	43.25 ± 15.47	147.15 ± 20.36	103.26 ± 3.35	32.526	<0.005
细胞侵袭数目 (个)	100.12 ± 1.94	38.53 ± 14.76	145.46 ± 22.73	97.87 ± 3.25	30.813	<0.005

注: ①与②比较, $t=2.625, 5.380, 5.513$, 均 $P<0.05$ 。①与③比较, $t=2.455, 4.456, 4.058$, 均 $P<0.05$ 。②与④比较, $t=2.371, 5.681, 5.312$, 均 $P<0.05$ 。

2.5 miR-505-3p 调控 c-MYC 对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 见表 4。Western blot 检测显示 miR-505-3p 过表达组 Wnt, β -catenin 相对表达较 NC 组明显降低 ($P<0.05$); c-MYC 过表达组 Wnt, β -catenin 相对表达较 NC 组明显升高 ($P<0.05$), 差异均有统计学意义; 共转染 miR-505-3p 过表达

组 +c-MYC 过表达组 Wnt 和 β -catenin 相对表达被逆转, 接近正常水平。提示 c-MYC 可以逆转 miR-505-3p 过表达对信号通路的抑制作用, miR-505-3p 通过靶向调控 c-MYC 参与 Wnt/ β -catenin 信号通路激活进而影响胃癌的发生发展。

表 4 miR-505-3p 和 c-MYC 相互作用对 Wnt/ β -catenin 通路关键蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

蛋白表达	NC 组 ^①	miR-505-3p 过表达组 ^②	c-MYC 过表达组 ^③	miR-505-3p 过表达 + c-MYC 过表达组 ^④	F	P
Wnt	1.01 ± 0.02	0.46 ± 0.07	1.51 ± 0.14	0.98 ± 0.05	80.555	<0.001
β -catenin	1.02 ± 0.02	0.50 ± 0.05	1.54 ± 0.16	1.07 ± 0.04	72.116	<0.001

注: ①与②比较, $t=8.139, 7.342$, 均 $P<0.001$ 。①与③比较, $t=7.399, 7.342$, 均 $P<0.001$ 。②与④比较, $t=7.695, 8.048$, 均 $P<0.001$ 。

3 讨论

近年基于分子生物学的研究发现, 肿瘤的发生发展是多基因、多步骤、多通路参与的复杂过程, 原癌基因的激活及抑癌基因的失活导致基因异常表达, 参与了肿瘤的发生发展^[9]。研究发现, miRNAs 作为重要的基因调控因子, 可与 mRNA 的 3' 非翻译区互补结合使其靶向降解、阻止其翻译, 通过表观遗传学水平影响基因表达, 一定条件下可作用原癌或抑癌基因发挥作用^[3]。证实 miRNAs 表达失调可以参与维持肿瘤细胞增殖、细胞死亡抵抗、侵袭转移激活及血管生成和多药耐药, 参与生物体内多种重要的生理过程^[10]。越来越多研究证实, miRNAs 与包括胃癌在内的多种肿瘤的发生发展关系密切, 是肿瘤预后评估的潜在标记物及治疗靶点^[11]。因此, 积极探究 miRNAs 在胃癌发生发展中的生物学功能及作用意义显著。

研究表明, miR-505-3p 是一种肿瘤相关基因, 是促进肿瘤形成发展的原癌基因, 也是肿瘤抑制基因^[6]。如既往研究报道, lncRNA KTN1-AS1 通过负向调控 miR-505-3p 促进胶质瘤细胞增殖和侵袭^[12]。lncRNA ZEB1-AS1 通过调控 miR-505-3p/trib2 轴促进胰腺癌进展^[7]。miR-505-3p 下调预示着前列腺癌无骨转移生存期较差^[8]。miR-505-3p 可抑制乳腺癌细胞增殖, 促进耐药细胞凋亡; lncRNA DLX6-AS1

通过调控 miR-505-3p/RUNX2 轴促进乳腺癌的发生发展, 表明 miR-505-3p 在肿瘤恶性进展中的致癌基因属性^[13]。此外还发现, SRSF1 自结合机制抑制 miR-505-3p 抑制神经肿瘤细胞系增殖。提示 miR-505-3p 与癌症的发生发展关系密切, 是肿瘤研究的新的分子靶标^[14]。本研究经探究 miR-505-3p 在胃癌中的表达作用, 发现胃癌组织及细胞中 miR-505-3p 表达下调, 上调 miR-505-3p 可显著抑制胃癌细胞增殖、克隆形成及迁移、侵袭, 发挥抑癌基因作用。肿瘤中不同 miRNA 通过不同靶基因发挥作用, 因此研究利用生物信息学对其发挥作用的靶标基因进行分析, 证实 c-MYC 是 miR-505-3p 的下游靶标, miR-505-3p 负向调控 c-MYC 表达。研究报道, c-MYC 表达与胃癌患者预后呈正相关^[15]; c-MYC 促进了前列腺癌的发生发展, MYC 癌基因参与了许多人类癌症的发生^[16], 最新对其表达和功能的研究为肿瘤治疗提供了可能。另发现类药物分子可以抑制溴域蛋白对 MYC 的激活, 从而在体内抑制肿瘤, 其对肿瘤起始具有重要调控作用^[17]。本研究结果表明 miR-505-3 通过靶向调控 c-MYC 表达来参与胃癌细胞的生物学行为。

肿瘤基因发挥作用常与相关信号通路的激活或失活关系密切。目前研究发现与胃癌恶性转化及进展相关的信号通路有 NF- κ B, Wnt/ β -catenin 及

JAK/STAT 等, 其中对 Wnt/ β -catenin 通路的研究较为成熟。Wnt/ β -catenin 是调节生长发育的关键途径, 其传导途径主要由膜蛋白受体和配体蛋白质 Wnt 结合激活, 参与细胞生长、增殖、凋亡及组织稳态的调控; β -catenin 是 E-cadherin 结合蛋白, 可参与细胞间的黏附调节, 是 Wnt 信号通路的转录调节因子, 并证实 Wnt 通路与 EMT 诱导过程关系密切^[18-19]。如据相关研究报道, 膀胱癌中 Wnt/ β -catenin 减弱细胞间黏附诱导 EMT 发生过程, 在膀胱癌转移中起重要作用^[20]。LI 等^[21] 研究报道, VGLL4 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 EMT, 参与胃癌细胞的迁移及侵袭。并有研究报道, Wnt 途径失调是引起人类恶性肿瘤发生进展的启动因素, 约 $\geq 40\%$ 的胃癌组织细胞中 Wnt/ β -catenin 信号传导异常改变^[22]。猜测 miR-505-3 靶向调控 c-MYC 参与胃癌发生发展可能与 Wnt/ β -catenin 信号通路激活有关。本探究进一步探究发现, miR-505-3p 过表达可抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路激活, c-MYC 可逆转 miR-505-3p mimic 对信号通路的抑制作用, 证实 miR-505-3p 通过靶向调控 c-MYC 介导 Wnt/ β -catenin 信号通路激活进而影响了胃癌的发生发展。然其更深入的作用机制还需后期进一步探究分析, 对 miR-505-3p/c-MYC 轴的进一步研究可为开发新的胃癌治疗策略提供基础。

综上所述, 胃癌组织细胞中 miR-505-3p 表达显著下调, 过表达 miR-505-3p 可显著抑制细胞的增殖、克隆形成及迁移、侵袭, 是一个潜在的胃癌防治靶点。miR-505-3p 通过靶向调控 c-MYC 表达介导 Wnt/ β -catenin 信号通路激活进而发挥作用参与胃癌的发生发展过程。

参考文献:

- [1] 刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020 全球癌症统计报告解读 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021,7(2):1-14.
LIU Zongchao, LI Zhexuan, ZHANG Yang, et al. Interpretation on the report of Global Cancer Statistics 2020 [J]. Journal of Multidisciplinary Cancer Management(Electronic Version), 2021,7(2):1-14.
- [2] 张振, 潘晴, 刘旭, 等. circRNA 与肿瘤发生的研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33 (2) : 157-159, 164.
ZHANG Zhen, PAN Qing, LIU Xu, et al. Research progress of the relationship between circular RNA and tumorigenesis [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018,33 (2): 157-159, 164.
- [3] AGHAEI-BAKHTIARI S H, AREFIAN E, LAU P. MiRandb: a resource of online services for miRNA research[J]. Brief Bioinform, 2018, 19(2):254-262.
- [4] KARIMZADEH M R, POURDAVOUD P, EHTESHAM N, et al. Regulation of DNA methylation machinery by epi-miRNAs in human cancer: emerging new targets in cancer therapy[J]. Cancer Gene Ther, 2021, 8(3-4):157-174.
- [5] 高红敏, 杨红英, 刘鑫. 血清中 microRNA-106b 对宫颈癌患者的早期诊断及预后预测价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(6):85-86, 182.
GAO Hongmin, YANG Hongying, LIU Xin. Value analysis of serum microRNA-106b in early diagnosis of cervical cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020,35 (6): 85-86, 182.
- [6] CHENG Zhenlin, WANG Bin, ZHANG Cheng. MicroRNA-505-3p inhibits development of glioma by targeting HMGB1 and regulating AKT expression[J]. Oncology Letters, 2020, 20(2): 1663-1670.
- [7] WEI Guohua, LU Ting, SHEN Jian, et al. LncRNA ZEB1-AS1 promotes pancreatic cancer progression by regulating miR-505-3p/TRIB2 axis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 528(4):644-649.
- [8] TANG Yubo, WU Bowen, HUANG Shuai, et al. Downregulation of miR-505-3p predicts poor bone metastasis-free survival in prostate cancer[J]. Oncol Rep, 2019, 41(1):57-66.
- [9] 陈世发, 赵礼金. 肝癌发生发展机制的研究进展及其治疗现状 [J]. 中国普通外科杂志, 2018, 27(7):910-923.
CHEN Shifa, ZHAO Lijin. Research progress on mechanisms for occurrence of liver cancer and its treatment status[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2018,27 (7): 910-923.
- [10] 陈玲玲, 冯珊珊, 范祖森, 等. 非编码 RNA 研究进展 [J]. 中国科学: 生命科学, 2019,49(12):1573-1605.
CHEN Lingling, FENG Shanshan, FAN Zusen, et al. Progress in non-coding RNA research [J]. Chinese Science: Life Science, 2019,49 (12): 1573-1605.
- [11] 李羿, 申兵冰, 徐小松, 等. 外泌体 miRNA 与疾病诊治的研究进展 [J]. 临床与病理杂志, 2018, 38 (9): 2003-2017.
LI Yi, SHEN Bingbing, XU Xiaosong, et al. Research progress in the exosomes miRNA and disease diagnosis and treatment [J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018,38 (9): 2003-2017.
- [12] MU Yulong, TANG Qiang, FENG Haiyan, et al. LncRNA KTN1-AS1 promotes glioma cell proliferation and invasion by negatively regulating miR-505-3p[J]. Oncol Rep, 2020, 44(6):2645-2655.
- [13] ZHAO Ping, GUAN Haitao, DAI Zhijun, et al. Long noncoding RNA DLX6-AS1 promotes breast cancer progression via miR-505-3p/RUNX2 axis[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 865:172778.
- [14] YANG Kan, TONG Li, LI Kai, et al. A SRSF1 self-binding mechanism restrains miR505-3p from inhibiting proliferation of neural tumor cell lines[J]. Anticancer Drugs, 2018, 29(1):40-49.
- [15] WU C C, YANG Y, MAO F F, et al. Long non-coding RNA PLAC2 suppresses the survival of gastric cancer cells through down-regulating C-Myc[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(23):12187-12193.

遗传 RHD*weak D type 72 和 RHD- 等位基因, 其 RHD*weak D type 72 等位基因由遗传获得, 而非由个体基因变异形成。家系调查结果为后续 RHD*weak D type 72 等位基因频率调查提供一定的参考意义。

参考文献:

- [1] LORD J. Time to re-evaluate rhesus testing and anti-D prophylaxis in abortion care[J]. *BMJ Sexual & Reproductive Health*, 2021, 47(2): 81-83.
- [2] EVANS M L, HOLMES B, DOWLING K, et al. Evaluating automated titre score as an alternative to continuous flow analysis for the prediction of passive anti-D in pregnancy[J]. *Transfusion Medicine (Oxford, England)*, 2021, 31(1): 36-42.
- [3] 饶神宗, 李归宁, 张敏, 等. RhD 抗原变异型同种免疫反应研究 [J]. *临床血液学杂志*, 2017, 30(8): 591-593.
RAO Shenzong, LI Guining, ZHANG Min, et al. The study of isoimmunity of RhD antigenic variant[J]. *Journal of Clinical Hematology*, 2017, 30(8): 591-593.
- [4] 姚韵, 许进明, 赵凌, 等. D 变异型受血者产生同种抗 -D 合并抗 -E 及抗 -C 抗体 1 例 [J]. *临床血液学杂志*, 2020, 33(2): 140-142, 147.
YAO Yun, XU Jinming, ZHAO Ling, et al. A case of recipient of D-variant type produced homologous anti-D combined with anti-E and anti-C antibodies[J]. *Journal of Clinical Hematology*, 2020, 33(2): 140-142, 147.
- [5] SANDLER S G, FLEGEL W A, WESTHOFF C M, et al. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype[J]. *Transfusion*, 2015, 55(3):680-689.
- [6] MANGWANA S, GANGWAR V. Anti-D antibody in a D-positive patient: Autoantibody or development of alloantibody after platelet transfusion[J]. *Global Journal of Transfusion Medicine*, 2019, 4(2):231.
- [7] 吴筱莹, 庄乃保, 徐红先, 等. 1 例新的弱 D 型的鉴

定 [J]. *临床输血与检验*, 2012, 14(2):103-106, 109.

- WU Xiaoying, ZHUANG Naibao, XU Hongxian, et al. An identification of a new weak D phenotype[J]. *Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine*, 2012, 14(2): 103-106, 109.
- [8] JI Y L, LUO H, WEN J Z, et al. RHD genotype and zygosity analysis in the Chinese Southern Han D+, D- and D variant donors using the multiplex ligation-dependent probe amplification assay[J]. *Vox Sang*, 2017, 112(7):660-670.
- [9] ZHANG Xu, LI Guiji, ZHOU Zhuren, et al. Molecular and computational analysis of 45 samples with a serologic weak D phenotype detected among 132 479 blood donors in Northeast China[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2019, 17(1): 393.
- [10] GAO Ming, CHEN Yuping. The RHD variants in Chinese population[J]. *Blood and Genomics*, 2020. DOI: 10.46701/BG.2020012020106
- [11] KÖRMÖCZI G F, GASSNER C, SHAO C P, et al. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization[J]. *Transfusion*, 2005, 45(10):1561-1567.
- [12] 刘静娟, 李越, 何谦, 等. 陕西地区 RhD 阴性儿童患者 Rh 表型分布特征研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(3):66-68.
LIU Jingjuan, LI Yue, HE Qian, et al. Distribution of RhD phenotypes among RhD-negative children patients in Shaanxi Province [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2020, 35(3):66-68.
- [13] 党盼玉, 苏珊, 刘志新, 等. RhD 阴性孕妇临床备血用血情况分析 [J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(1): 130-132.
DANG Panyu, SU Shan, LIU Zhixin, et al. Analysis on RBC preparation and transfusion of RhD negative pregnant women [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2020, 35(1):130-132.

收稿日期: 2021-07-16

修回日期: 2021-12-15

(上接第 74 页)

- [16] ZHAO Mingfeng, MEI Qi, LI Xinjun, et al. CUL4B/miR-33b/C-MYC axis promotes prostate cancer progression[J]. *Prostate*, 2019, 79(5):480-488.
- [17] WANG Chen, ZHANG Jiawei, YIN Jie, et al. Alternative approaches to target MYC for cancer treatment[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):117.
- [18] 张遥, 任秀智, 韩金祥, 等. Wnt 信号通路与人疾病相关性的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(1):81-86.
ZHANG Yao, REN Xiuzhi, HAN Jinxiang, et al. Progress in study on relationship between Wnt signaling pathway and human diseases [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2018, 31(1): 81-86.
- [19] 丁界先, 张津, 陈永刚, 等. Wnt 信号通路与肿瘤发生的研究进展 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2019, 33(1):73-77.
DING Jiexian, ZHANG Jin, CHEN Yonggang, et al. Progress in Wnt signaling pathway and tumorigenesis

[J]. *Practical Oncology Journal*, 2019, 33(1):73-77.

- [20] HUANG Houfeng, FAN Xinrong, ZHANG Xuebin, et al. LncRNA CARLo-7 facilitates proliferation, migration, invasion, and EMT of bladder cancer cells by regulating Wnt/ β -catenin and JAK2/STAT3 signaling pathways [J]. *Transl Androl Urol*, 2020, 9(5):2251-2261.
- [21] LI Hui, WANG Ziwei, ZHANG Wei, et al. VGLL4 inhibits EMT in part through suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric cancer[J]. *Medical Oncology*, 2015, 32(3):83.
- [22] 王骞, 谭林, 屈伟明, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路在胃癌中的研究进展 [J]. *医学综述*, 2020, 26(10): 1935-1940.
WANG Qian, TAN Lin, QU Weiming, et al. Research Progress of Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric cancer [J]. *Medical Recapitulate*, 2020, 26(10): 1935-1940.

收稿日期: 2021-09-13

修回日期: 2021-10-20