

# 微小 RNA-140-5p 靶向 *EGR-2* 基因调控胃癌细胞增殖凋亡的作用研究

王兴, 陈淑卿

杭州市肿瘤医院, 浙江 杭州 310000

**摘要:** 目的 探讨 microRNA-140-5p(miRNA-140-5p)在胃癌患者组织中的表达及其对癌细胞增殖、凋亡的影响。方法 收集 2017 年 5 月到 2018 年 5 月杭州市肿瘤医院住院的 100 例胃癌患者的组织样本,利用荧光定量 PCR 检测 miRNA-140-5p 在胃癌组织和癌旁组织中的表达并分析其临床意义。采用 CCK-8 法、Annexin V-FITC/PI 双染法分析 miRNA-140-mimics、miRNA-140-inhibitor 对人胃癌细胞系 BGC-823 增殖和凋亡的影响,以及检测其对胃癌细胞 *TGF-β*、*ERK1*、*Smad2*、*IGF-1R*、*PI3K*、*Ras*、*AKT*、*MAPK*、*Ki67* 基因表达的影响。采用生物信息学、Western Blotting、双荧光素酶报告实验等方法预测并验证 miRNA-140-5p 的下游靶基因。结果 胃癌患者癌组织中 miRNA-140-5p 的表达水平显著低于癌旁组织( $P<0.001$ );ROC 曲线示 miRNA-140-5p 诊断胃癌的曲线下面积为 0.803(95% *CI*:0.723~0.851);与对照组相比,miRNA-140-mimics 组中的细胞增殖率明显降低而凋亡率升高(均  $P<0.05$ );*TGF-β*、*ERK1*、*Smad2*、*IGF-1R*、*PI3K*、*Ras*、*AKT*、*MAPK* mRNA 表达,以及 *Ki67* 蛋白表达明显下调( $P<0.05$ );TargetsCan 数据库预测和双荧光素酶检验结果发现早期生长反应蛋白 2(*EGR2*)是 miRNA-140-5p 的下游靶基因之一,较于空白对照组,miRNA-140-mimics 组中 *EGR2* 含量降低( $P<0.001$ )。结论 miRNA-140-5p 在胃癌组织中表达下调,可能通过靶向 *EGR2* 来调控胃癌细胞的增殖与凋亡,miRNA-140-5p 有可能成为胃癌诊断和新型生物治疗的靶点。

**关键词:** miRNA-140-5p; 胃癌; *EGR2*

**中图分类号:** R735.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)11-1391-06 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.11.031

胃癌的发病率位居消化道肿瘤第一位,且术后复发率高,以中老年男性多见,近年来青年群体发病率有呈升高的趋势<sup>[1-2]</sup>。胃癌早期症状不典型,容易漏诊和误诊,深切影响着患者的生存和生活质量<sup>[3]</sup>。最主要的原因是在病发早期,缺乏特异性较好的生物学标记和检测工具而造成严重的预后不良。MicroRNAs(miRNAs)是一类长度约 22 个核苷酸的内源非编码单链 RNA 分子,而 miRNA-140-5p 是近几年比较热门且被认为对肿瘤免疫系统具有调节作用的 miRNA<sup>[4-5]</sup>。研究发现 miRNA-140-5p 在非小细胞肺癌、乳腺癌、骨肉瘤等癌组织中表达升高<sup>[6-9]</sup>,然而,miRNA-140-5p 在胃癌中的作用鲜少报道。本研究将检测与分析 miRNA-140-5p 在胃癌患者癌组织中表达及临床意义,以及考察其对胃癌细胞增殖、凋亡的影响,并初步探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料采集** 选取 2017 年 5 月-2018 年 5 月期间杭州市肿瘤医院收治的 100 例胃癌患者为实验对象,并进行临床病理指标(性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤直

径、淋巴结转移、组织分化程度、TNM 分期)的记录。患者平均年龄为(63.18±11.57)岁,性别男/女比例为 2.70,肿瘤直径大于 2 cm 的有 35 例,大部分患者(83 例)均有淋巴结转移,肿瘤组织高度分化的占 58%,59 例患者属于中晚期。分别采集癌组织和癌旁组织标本,本次临床研究均获受试者知情并签署知情同意书。纳入标准:符合原发性胃癌的诊断标准,并做活组织检查确诊,年龄大于 18 岁,性别不限,心、肝、肾功能良好,无其他严重疾病者;排除标准:转移性胃癌、伴有其他系统肿瘤疾病、心脑血管疾病、胃炎患者、胃溃疡患者、酒精药物滥用史、精神疾病史等。所采集的组织标本均于液氮中保存备用。人胃癌细胞株 BGC-823 和人正常胃黏膜上皮细胞系 RGM-1 均由中国科学院上海生命科学院细胞库提供。

**1.2 Trizol 法提取癌组织中的总 RNA** 首先研磨组织块成粉末时加入 1 ml 的 Trizol,研磨至组织全部溶解。静置 3~10 min 后加入 1/4 体积的氯仿,震荡 1 min,静置分层后 4℃ 离心,12 000 rpm,5 min。吸取上清加入等体积的酚:氯仿,震荡 1 min,静置 3~5 min 后分层,4℃ 离心,12 000 rpm,5 min,取上清。加入等体积的预冷的异丙醇混匀,冰上静置 30 min,4℃ 离心 12 000 rpm,30 min,弃上清。加入 100 μl 70%乙醇,将

**作者简介:** 王兴(1991-),男,浙江温州人,本科,药师,研究方向:肿瘤学。

沉淀吹起,4 ℃ 12 000 rpm,5 min,弃上清,空气中挥发乙醇后加入 20  $\mu$ l DEPC 水溶解。分光光度计检测 RNA 浓度,将总 RNA 稀释备用。

1.3 荧光定量 PCR 检测 miRNA 采用 HiScript<sup>®</sup> II Reverse Transcriptase 试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)将提取出来的总 RNA 逆转录合成 cDNA,反应体系为 20  $\mu$ l,反应条件为 42 ℃ 3 min,60 ℃ 15 s,85 ℃ 5 min。以 cDNA 为模板,利用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司)进行 PCR 扩增,反应体系为 20  $\mu$ l,反应条件为 95 ℃ 2 min,1 循环;60 ℃ 5 s,95 ℃ 10 s,40 个循环。以 U6 作为实验的内参基因,相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  形式表示,其中  $\Delta C_t = C_{T(miRNA)} - C_{T(U6)}$ 。每孔共设副孔两个,重复三次。miRNA-140-5p 上游引物序列:5'-ACACTCCAGCTGGGTGAGAACTGAATTCCA-3',下游引物序列:5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCG-GCAATTCAGTTGAGAACCCAT-3';U6 上游引物序列:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游引物序列:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.4 细胞转染分组 将人胃癌细胞株 BGC-823 分为三组:miRNA-140-mimics 组,miRNA-140-inhibitor 组和空白对照组(由上海吉玛制药技术有限公司合成)。未用 mimics/inhibitor 而只有 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)处理的作为空白对照组。首先用 DEPC 水配制成终浓度为 50 nM 的 mimics/inhibitor,置于-80 ℃ 保存。接种细胞于 6 孔板中,每孔约  $5.0 \times 10^5$  细胞。培养 12 h 后对细胞进行转染,用 500  $\mu$ l opti-MEM 稀释 20  $\mu$ l mimics,用 500  $\mu$ l opti-MEM 稀释 20  $\mu$ l inhibitor,用 500  $\mu$ l opti-MEM 稀释 10  $\mu$ l lip 2000,三组均作用 5 min。24 h 后对转染细胞进行换液。最后用 q-PCR 验证三组细胞的转染效率。

1.5 靶基因预测和筛选 利用生物信息学数据库 Targetscan (<http://www.targetscan.org/>) 预测 miRNA-140-5p 的靶基因,统计靶基因的个数,列出权重分数绝对值高于 0.50 的进行筛选,结合文献选取其中与细胞增殖、凋亡相关的 EGR-2 基因进行下一步研究。

1.6 CCK-8 法检测细胞增殖 实验采用 CCK-8 法检测各组细胞于转染后 0、6、12、24、48 h 时间点的增殖情况。将三组细胞调整至  $1.0 \times 10^5$ /孔,取 100  $\mu$ l/孔在 96 孔板中接种,放置于培养箱中培养。往每孔加入 200  $\mu$ l 的 CCK-8 溶液(APEX-BIO, USA),将培养板在培养箱内孵育 4 h,不用清洗,直接用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。每组设两个副孔,重复三次。

1.7 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞的凋亡情

况 将转染后的细胞培养 24 h,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞后血清终止消化,离心 300 g 5 min 收集细胞,注意胰酶消化时间不宜过长,否则会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-FITC 的结合。用冰 PBS 清洗细胞一次,300 g 离心 5 min。加入 300  $\mu$ l 的 1 $\times$  Binding Buffer 悬浮细胞。加入 5  $\mu$ l 的 Annexin V-FITC(Sigma, USA)混匀后,避光,室温孵育 15 min。上机前 5 min 再加入 5  $\mu$ l 的 PI 染色。

1.8 Western-blot 检测 EGR2 的表达水平 首先加入 RIPA 缓冲液、PMSF 到目标样本中,利用 Polytron 进一步匀浆(15 000 r, 1 min)4 ℃,冰上孵育 30 min。移入离心管 4 ℃ 离心 20 000 g 15 min。进行 Bradford 比色法测定蛋白质浓度。取相同质量的细胞裂解液,并加等体积的 2 $\times$ 电泳加样缓冲液,沸水浴中 3 min,上样。电泳(20 mA)。电转膜仪转膜(100 mA 40 min)。膜用丽春红染色,胶用考马斯亮蓝染色。最后显色。

1.9 双荧光素酶报告实验检测 miRNA 与 EGR2 的作用关系 利用双荧光素酶靶标实验检测 EGR2 mRNA 的 3'-UTR 是否为 miR-140-5p 的直接靶蛋白,EGR2 mRNA 的野生型全长 3'-UTR 以及突变型 3'-UTR 扩增并连接到 psi-CHECK-2 载体(Promega, 美国),分别命名为野生型 WT-EGR2 psiCHECKTM-2 载体组和突变型 MT-EGR2 psiCHECKTM-2 载体组。细胞共转染 200 nmol/L miRNA-140-5p mimics 和 100 ng 质粒,24 孔板培养 48 h。收集细胞裂解,海肾和萤火虫荧光素酶荧光强度使用 Dual-Luciferase 报告分析系统进行分析。重复三次。

1.10 细胞免疫化学法检测 Ki67 基因表达 取出盖玻片用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min;0.1% Triton $\times$ 100,4 ℃ 10 min;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵 10 min;滴加血清封闭液,室温湿盒内孵育 30 min,封闭非特异性抗原。倾去血清后直接滴加一抗 Ki67(1:100)(南京福麦斯生物科技有限公司)使其完全覆盖细胞,于 4 ℃ 下过夜;PBS 洗 3 次。加入生物素化羊抗兔 IgG(1:200)(南京福麦斯生物科技有限公司),37 ℃ 30 min,PBS 洗 3 次。每片滴加 DAB 100  $\mu$ l,显微镜下观察,至阳性显色明显时用自来水冲洗,终止显色。用苏木精复染,自来水充分冲洗。乙醇脱水。二甲苯透明、中性树胶封片。Ki67 阳性表现为细胞核内棕黄色细颗粒状沉淀,每张切片观察 10 个以上典型视野( $\times 400$ ),至少计数 200 个细胞。以棕色核染为阳性细胞,其百分比为 Ki67 细胞增殖指数。

1.11 统计学分法 文中所有实验结果数据在 SPSS 20.0 软件中统计分析,统计图在 Graphpad Prism

8 软件中绘制和编辑加工,利用 Pearson 卡方检验比较 miRNA-140-5p 在各临床病理信息分组的表达差异;采用配对 *t* 检验比较癌组织和癌旁组织间均数差异,采用独立 *t* 检验分析两组独立样本间的均数差异,采用 ANOVA 检验进行多组间均数差异的比较。绘制受试者工作特征曲线(ROC)并计算曲线下面积进行敏感性分析与特异性分析。实验数据中计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-140 在胃癌组织中表达情况 采用 q-PCR 法检测胃癌患者癌组织和癌旁组织中 miRNA-140-5p 的表达水平。相对于癌旁组织,胃癌组织中 miRNA-140-5p 的表达水平显著降低( $1.0\pm0.3$  vs.  $0.36\pm0.09$ , $P<0.001$ ),见图 1。

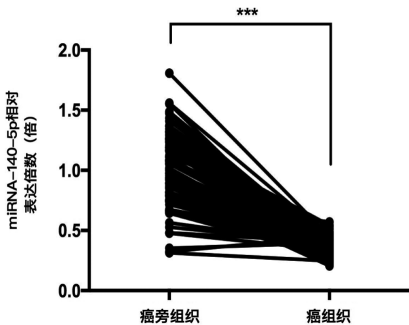


图 1 癌/癌旁组织中 miRNA-140-5p 的表达水平

采用卡方检验分析各临床病理信息下 miRNA-140-5p 的表达差异,结果表明,miRNA-140-5p 在性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤部位组别中的表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而在组织分化程度、淋巴结转移、TNM 分期中差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 各临床特征下 miRNA-140-5p 的表达情况

特征	例数	miRNA-140-5p *		$\chi^2$ 值	P 值
		低表达组(n,%)	高表达组(n,%)		
性别					
男	73	36(49.32)	37(50.68)	2.034	0.154
女	27	9(33.33)	18(66.67)		
年龄(岁)					
<55	31	18(58.06)	13(41.94)	3.098	0.078
≥55	69	27(39.13)	42(60.87)		
肿瘤直径(cm)					
<2	65	33(50.77)	32(49.23)	2.498	0.114
≥2	35	12(34.29)	23(65.71)		
肿瘤位置					
贲门	22	11(50.00)	11(50.00)	1.504	0.471
胃体	66	24(36.36)	42(63.64)		
幽门	12	10(83.33)	2(16.67)		
组织分化程度					
中低	42	12(28.57)	30(71.43)	7.897	0.005
高	58	33(56.90)	25(43.10)		

续表 1

特征	例数	miRNA-140-5p *		$\chi^2$ 值	P 值
		低表达组(n,%)	高表达组(n,%)		
淋巴结转移					
是	83	29(34.94)	54(65.06)	4.984	0.026
否	27	16(59.26)	11(40.74)		
T 分期					
T1,T2	41	27(65.85)	14(34.15)	12.210	<0.001
T3,T4	59	18(30.51)	41(69.49)		

注: \* 以胃癌/癌旁组织中 miRNA-140-5p q-PCR 扩增倍数比值的平均值为界分为低表达组、高表达组。

在进行细胞实验之前先检测人胃癌细胞株 BGC-823 和人正常胃黏膜上皮细胞系 RGM-1 中 miRNA-140-5p 的表达差异,结果显示,BGC-823 细胞中 miRNA-140-5p 的表达水平明显低于 RGM-1 细胞( $1.0\pm0.2$  vs.  $0.28\pm0.07$ , $P=0.004$ ),见图 2。

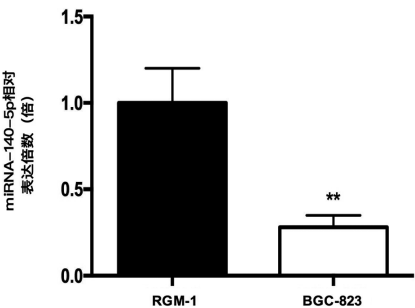


图 2 不同细胞株中 miRNA-140-5p 的表达差异

2.2 ROC 曲线关于 miRNA-140-5p 敏感性和特异性分析 绘制 ROC 曲线分析胃癌患者癌组织/癌旁组织中 miRNA-140-5p 的敏感性和特异性差异,曲线下面积为 0.803(95%CI:0.723~0.851, $P<0.001$ ),见图 3。

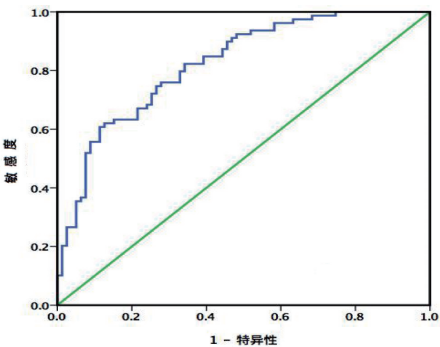


图 3 癌/癌旁组织中 miRNA-140-5p 的 ROC 曲线

2.3 miRNA-140 的转染效率 采用 q-PCR 法验证转染后 miRNA-140-mimics 组,miRNA-140-inhibitor 组和空白对照组中 miRNA-140-5p 的表达水平。结果如图 4 所示,与空白对照组相比,miRNA-140-5p 在 miRNA-140-mimics 组中的表达水平显著升高( $P=0.006$ ),在 miRNA-140-inhibitor 组表达水平显著降低( $P=0.017$ ),证明瞬时转染有效,可进行下一步



实验。

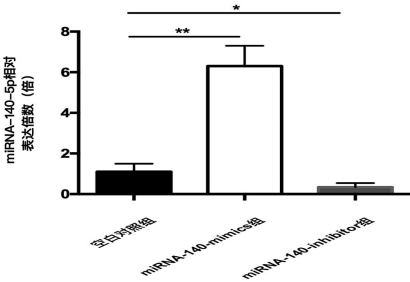


图 4 q-PCR 验证组间 miRNA-140 表达差异

2.4 CCK-8 法检测细胞增殖状况 采用 CCK8 法检测三组 BGC-823 细胞在时间点 0、6、12、24、48 h 的增殖情况。如图 5 显示,与空白对照组相比,miRNA-140-mimics 组在 12、24、48 h 时间点细胞增殖水平明显降低( $P<0.001$ );同时 miRNA-140-inhibitor 组在 12、24、48 h 时间点细胞增殖水平升高,差异有统计学意义( $P<0.001$ )。

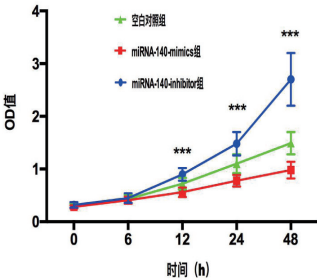
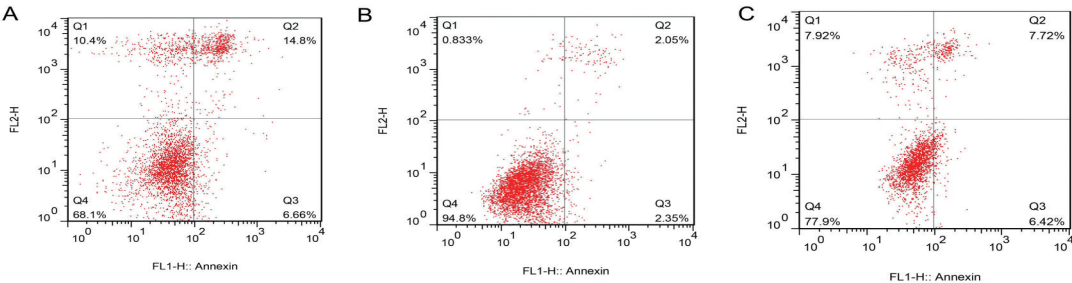


图 5 CCK-8 法检测三组细胞的增殖水平

2.5 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞仪检测三组 BGC-823 细胞在转染后 24 h 的凋亡水平。如图 6、图 7 所示,与空白对照组相比,miRNA-140-inhibitor 组的凋亡率显著降低( $2.65\pm0.7$  vs.  $7.53\pm1.4$ )差异有统计学意义( $P=0.006$ );而 miRNA-140-mimics 组的凋亡率明显升高( $17.12\pm4.2$  vs.  $7.53\pm1.4$ ),差异有统计学意义( $P=0.02$ )。



A miRNA-140-mimics 组;B miRNA-140-inhibitor 组;C 空白对照组

图 6 三组细胞的凋亡流式图

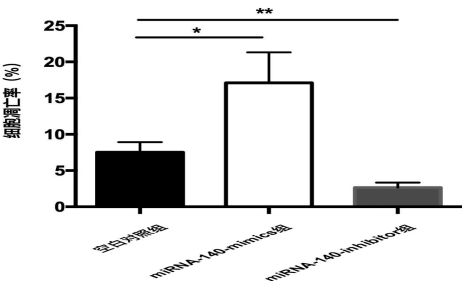


图 7 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞的凋亡比例

2.6 miRNA-140 可靶向下调 EGR2 的表达 利用 Targetscan 数据库,生信学分析预测 EGR-2 基因是

miRNA-140-5p 的下游靶基因,两者结合位点预测见图 8。为此分别构建了 EGR2 野生型和突变型荧光素酶报告载体,采用双荧光素酶报告实验检测发现,miRNA-140-5p 能明显抑制野生型 WT-EGR2 psiCHECKTM-2 载体的荧光强度( $P<0.001$ ),而无法影响突变型 MT-EGR2 psiCHECKTM-2 载体的荧光强度;Western Blotting 检测发现,三与对照组相比,miRNA-140-mimics 可明显下调 EGR2 蛋白表达,而 miRNA-140-inhibitor 上调 EGR2 蛋白的表达,如图 9 示。结果说明 miRNA-140 可靶向下调 EGR2 的表达。

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	PCT
Position 1143-1150 of EGR2 3' UTR	5' ...UCUUAUUAACGCAAAACACUA...	8mer	-0.54	99	-0.54	3.713	0.63
hsa-miR-140-5p	3' GAUGGUAUCCAAUUUGUGAC						

图 8 miRNA-140-5p 与靶基因 EGR-2 结合位点预测

2.7 miRNA-140-5p 调控增殖凋亡的机制研究 为了探索 miRNA-140-5p 调控增殖、凋亡的具体机制,利用 q-PCR 检测了每组 TGF- $\beta$ , ERK1, Smad2, IGF-1R, PI3K, Ras, AKT, MAPK 基因的表达水平,从而了解

miRNA-140-5p 调控增殖凋亡的相关基因和信号通路。结果显示,与对照组和 miRNA-140-inhibitor 组相比,miRNA-140-mimics 组中 TGF- $\beta$ , ERK1, Smad2, IGF-1R, PI3K, Ras, AKT, MAPK 基因的表达水平呈显

著下调趋势,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 11。

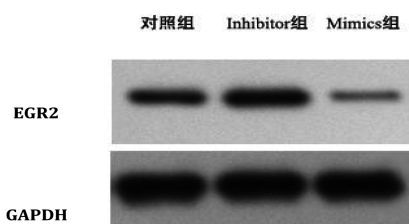
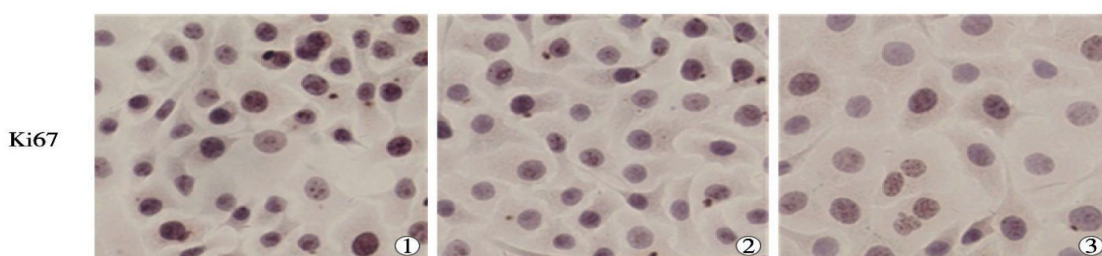


图9 WB检测三组细胞中EGR2蛋白含量

2.8 各组细胞 Ki67 表达情况 检测三组 BGC-823 细胞增殖相关抗原 Ki67 结果显示,与空白对照组相比,miRNA-140-inhibitor 组细胞形态饱满,多数细胞核被染成棕黄色,miRNA-140-mimics 组中细胞 Ki67 表达量明显减弱,细胞核呈淡染。三组之间差异有统计学意义( $P<0.001$ ),见图 12。



注:①miRNA-140-inhibitor 组;②空白对照组;③miRNA-140-mimics 组

图12 各组细胞 Ki67 表达情况( $\times 400$ )

### 3 讨论

胃癌是最常见的消化道系统肿瘤之一,好发于中老年男性,近年来世界上许多国家都报道胃癌的发病率和死亡率均呈明显升高趋势<sup>[10]</sup>。胃癌的病因至今尚不完全明确,初期临床表现无明显特异性,随着疾病的进展及肿瘤的转移,患者可出现一系列系统症状<sup>[11]</sup>。目前尚无有效的疾病早期诊断的有限手段。因此,明确有关胃癌发生发展的分子标记具有重要意义。如果能利用现代实验手段找出胃癌患者组织中的一些表达差异的生物标记物,那么对胃癌的早期诊断具有非常重要的科学价值。随着生物化学、分子生物学、免疫学、遗传学等基础学科的飞速发展,对肿瘤的研究日益深入,多种与肿瘤的发生发展密切相关的肿瘤标记物被发现,miRNAs 即是其中之一<sup>[5]</sup>。

miRNAs 是一类是一类内生的、长度约为 20~24 个核苷酸的小 RNA,其在细胞内具有多种重要的调节作用<sup>[4]</sup>。每个 miRNA 可以有多个靶基因,而几个 miRNA 也可以调节同一个基因。这种复杂的调节网络既可以通过一个 miRNA 来调控多个基因的表达,也可以通过几个 miRNA 的组合来精细调控某个基因的

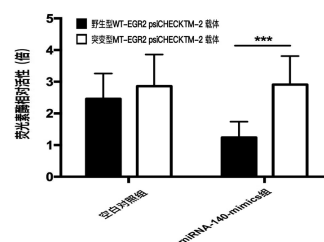


图10 各组细胞 EGR2 相对荧光素酶活性的比较

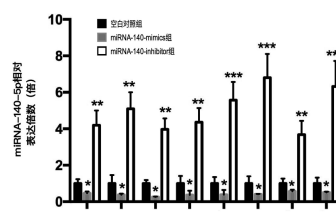


图11 各组中增殖凋亡相关基因的表达差异

表达。据推测,miRNA 调节着人类三分之一的基因<sup>[12]</sup>。其中,miRNA-140 是近几年来比较热门的 miRNA,既往文献报道,它在多种系统肿瘤中均有异常表达,与多种肿瘤细胞的发生发展密切相关。Liu Z 课题组<sup>[6]</sup>研究发现,miRNA-140-5p 在 Wilms' 瘤组织中低表达,前者可以抑制肿瘤细胞在 G1/S 期的增殖与代谢,作者还发现,TGFBR1 和 IGF1R 是 miRNA-140-5p 的下游靶基因,并且是通过 TGFBR1/SMAD2/3 和 IGF-1R/AKT 信号通路来调控肿瘤细胞的生长的。Flamini V<sup>[7]</sup>一篇研究结果显示,miRNA-140-5p 参与了非小细胞肺癌细胞的侵袭与迁移,前者的表达水平上调可以促进癌细胞的侵袭、迁移,还可以影响与外基质细胞的粘附力,并且细胞实验也从一定程度上验证了 miRNA-140-5p 在癌症中的治疗效果。Wei R 研究显示<sup>[8]</sup> miRNA-140-5p 通过调节人骨肉瘤细胞中肌醇 1,4,5-三磷酸激酶 2 的自噬作用,以减轻化疗药物诱导的细胞死亡。之前的研究<sup>[9]</sup>也揭示了 miRNA-140-5p 在早期乳腺癌发生发展中所扮演的角色。这些结果表明,miRNA-140 可以抑制癌细胞的生长。然而 miRNA-140 在胃癌中的作用目前尚未展开深入研究。

所以综合以上研究,本研究发现经 miRNA-140 mimics 和 inhibitor 转染后,过表达 miRNA-140 可以促进胃癌细胞株的凋亡并抑制其增殖,而下调 miRNA-140 可以促进癌细胞增殖并抑制其凋亡,这些结果提示 miRNA-140 在胃癌的发生过程中发挥着抑癌作用。

在胃癌细胞中,TGF- $\beta$  和 IGF-1R 通路在调节细胞生存、凋亡和炎症中起关键作用,TGF- $\beta$  和 IGF-1R 活化与胃癌的不良结局相关。最近一项基础研究<sup>[13]</sup>表明,TGF- $\beta$ 1、Smad2 表达水平高于正常胃黏膜组织,两者表达水平与胃癌的分化程度、临床分期、浸润深度及淋巴结转移关系密切。本研究发现 miRNA-140 过表达显著降低了胃癌细胞的 TGF- $\beta$ , Smad2, IGF-1R 的表达,对 TGF- $\beta$  和 IGF-1R 通路起到了抑制作用。

早期生长反应因子 EGR,属于即刻反应因子,其家族成员包括 EGR1、EGR2、EGR3、EGR4。该家族主要参与调节细胞的生长、分化和凋亡等过程。现已发现,EGR2 不仅影响 T/B 细胞的增殖分化,也与多条信号通路如 JAK/STAT、NF- $\kappa$ B 等有交叉点。近几年,有不少文献报道了 miRNAs 靶向 EGR-2 基因与胃癌的关系。miRNA-17-5p 通过靶向 EGR2 调控胃癌的增殖、侵袭、迁移<sup>[14]</sup>;miRNA-150 可以靶向 EGR-2 基因影响胃癌细胞的增殖<sup>[15]</sup>。但至今研究均没有 miRNA-140-5p 靶向 EGR-2 基因调控胃癌的报道,并且如何通过 TGF- $\beta$  和 IGF-1R 信号通路调控胃癌细胞的增殖凋亡目前也是一片空白。所以,将目光锁定 miRNA-140-5p 与靶基因 EGR-2 通过 TGF- $\beta$  和 IGF-1R 通路影响胃癌细胞的作用机制。所以本次实验可以得出结论:作为一个类抑癌分子标记物,miRNA-140-5p 可以通过靶向 EGR2 蛋白来调控胃癌细胞的增殖、凋亡且对胃癌的早期诊断具有一定的价值。

该实验中也有一定的局限性,细胞实验中选用了人胃癌细胞系 BGC-823,但细胞株与人体癌细胞之间具有一定的变异性,目前两者差异能否对实验结果构成影响尚不明确。此外,在实验设计方面该实验也具有一定的不足之处,由于各种客观因素影响仅收集 100 例胃癌患者的组织标本,且收集健康对照人群的胃组织标本相对非常困难,可行性较低,从而对研究结果产生一定的影响,后期有条件可适当增设健康对照组别和样本量进行实验补充,而 miRNA-140-5p 是否

受其他因素的影响,还有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] 刘礼,袁昌劲,郭敬杰等. 5-氮杂胞苷对 DKK3 去甲基化及对 SGC7901 胃癌细胞增殖的影响[J]. 实用预防医学,2018,25(2): 160-161.
- [2] Zhang J, Huang J, Wang X, et al. CMIP is oncogenic in human gastric cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2017,16(5):7277-7286.
- [3] Liu XX, Ye H, Wang P, et al. Identification of 14 as a potential biomarker in gastric cancer by proteomics based analysis[J]. Mol Med Rep, 2017,16(5):7759-7765.
- [4] Li Z, Wong SH, Shen J, et al. The role of microRNAs in ankylosing spondylitis[J]. Medicine (Baltimore), 2016,95(14):e3325.
- [5] Yang L, Du L, Yue Y, et al. miRNA copy number variants confer susceptibility to acute anterior uveitis with or without ankylosing spondylitis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017,58(4):1991-2001.
- [6] Liu Z, He F, OuYang S, et al. miR-140-5p could suppress tumor proliferation and progression by targeting TGFBR1/SMAD2/3 and IGF-1R/AKT signaling pathways in Wilms' tumor[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):405.
- [7] Flamini V, Jiang WG, Cui Y. Therapeutic role of MiR-140-5p for the treatment of non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 2017,37(8):4319-4327.
- [8] Wei R, Cao G, Deng Z, et al. miR-140-5p attenuates chemotherapeutic drug-induced cell death by regulating autophagy through inositol 1, 4,5-trisphosphate kinase 2 (IP3k2) in human osteosarcoma cells[J]. Biosci Rep, 2016,36(5):pii:e00392.
- [9] Wolfson B, Eades G, Zhou Q. Roles of microRNA-140 in stem cell-associated early stage breast cancer[J]. World J Stem Cells, 2014,6(5):591-597.
- [10] Zhang M, Huang S, Long D. MiR-381 inhibits migration and invasion in human gastric carcinoma through downregulated SOX4[J]. Oncol Lett, 2017,14(3):3760-3766.
- [11] 高飞,张立翔,姚矾. MACC1 和 CIP2A 蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 实用预防医学,2018,25(1):107-110.
- [12] Qudusi A, Shamim MS. Serum biomarkers for glioblastoma multiforme[J]. J Pak Med Assoc, 2019,69(6):913-914.
- [13] 陈浩,许浪. 胃癌组织中 1,25-二羟维生素 D<sub>3</sub>、TGF- $\beta$ 1 和 Smad2 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报,2013,48(3):370-373.
- [14] Chen P, Zhao H, Huang J, et al. MicroRNA-17-5p promotes gastric cancer proliferation, migration and invasion by directly targeting early growth response 2[J]. Am J Cancer Res, 2016,6(9):2010-2020.
- [15] Wu Q, Jin H, Yang Z, et al. MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic gene EGR2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010,392(3):340-345.

收稿日期:2019-07-16