

miR-302c 在胃癌中表达及对胃癌细胞侵袭和迁移影响的机制研究

刘浩¹, 孙丽娜², 卢媛媛¹, 赵晓迪¹, 王新¹, 樊代明¹

(1. 第四军医大学西京消化病医院, 肿瘤生物学国家重点实验室, 陕西 西安 710032; 2. 西安市儿童医院, 陕西 西安 710032)

摘要: [目的] 探讨 miR-302c 对人胃癌细胞侵袭和迁移能力的影响及机制。[方法] 实时荧光定量 PCR 法检测 miR-302c 在胃癌细胞系和正常胃黏膜上皮细胞中的表达情况。在 SGC7901 和 AGS 细胞中分别转染 miR-302c mimic 和 inhibitor 后, Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移能力变化。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测转染后环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 1 (CREB1) 的变化情况。[结果] 与永生化的正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 相比, miR-302c 在胃癌细胞系 SGC7901、MKN28、N87、MKN45 和 AGS 中表达降低。转染 mimic 和 inhibitor 后, miR-302c 在 SGC7901 和 AGS 中表达分别明显上调和下调 ($P < 0.001$)。Transwell 实验发现, 上调 miR-302c 后, SGC7901 细胞的侵袭和迁移能力明显降低, 而下调 miR-302c 后, AGS 细胞的侵袭和迁移能力明显增强。进一步研究发现, miR-302c 可抑制 CREB1 的表达。功能挽救实验证明 CREB1 可部分恢复 miR-302c 上调对 SGC7901 细胞侵袭和迁移的抑制作用。[结论] miR-302c 抑制胃癌细胞的侵袭和迁移, 其机制可能是通过直接靶向 CREB1。

关键词: miR-302c; 胃肿瘤; 侵袭; 转移; CREB1

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2019)02-0150-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2019.02.A014

MiR-302c Inhibits Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells by Targeting CREB1

LIU Hao¹, SUN Li-na², LU Yuan-yuan¹, ZHAO Xiao-di¹, WANG Xin¹, FAN Dai-ming¹

(1. PLA Air Force Military Medical University, State Key Laboratory of Cancer Biology, Xi'an 710032, China; 2. Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710032, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of miR-302c in gastric cancer (GC) cells and its relation to cell migration and invasion. [Methods] Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect miR-302c expression in GCSGC7901, MKN28, MKN45 and AGS cells and immortalized gastric epithelial cell line GES-1. Transwell assay was used to determine the migration and invasion abilities of SGC7901 and AGS cells transfected with miR-302c mimic and inhibitor, respectively. qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of CREB1 after transfection of miR-302c mimic and inhibitor in indicated cells. [Results] miR-302c was downregulated in GC cell lines compared with GES-1 cells. Overexpression of miR-302c significantly reduced migration, invasion and CREB1 expression of SGC7901 cells, while silencing of miR-302c significantly increased migration, invasion and CREB1 expression of AGS cells. Overexpression of CREB1 alleviated the decreased migration and invasion induced by miR-302c in SGC7901 cells. [Conclusion] miR-302c is downregulated in gastric cancer cell lines and can suppress cancer cell migration and invasion by targeting CREB1.

Key words: miR-302c; gastric neoplasms; migration; invasion; CREB1

胃癌是最常见的上消化道恶性肿瘤, 其发病率在全球范围内居第 4 位, 病死率居第 2 位^[1]。转移是

晚期胃癌的重要特征, 并且与约 90% 的胃癌死亡相关。然而, 胃癌转移的分子机制尚未完全阐明^[2]。miRNA 是一类广泛存在于真核生物中, 约含 18~26 个核苷酸的非编码 RNA, 作为转录后调节的重要分子, 其在肿瘤的发生发展及转移中发挥了重要作用^[3]。

收稿日期: 2018-10-10; 修回日期: 2018-11-16

基金项目: 国家重点研发计划资助 (2018YFC1313100); 国家自然科学基金资助项目 (81430072, 81602641, 81822031, 81572929)

通信作者: 樊代明, E-mail: daimingfan@fmmu.edu.cn

在胃癌转移中,miRNA 通过作用于促癌基因或抑癌基因而发挥促癌基因或抑癌基因的双重功能。例如,miR-143 和 miR-145 通过作用于癌基因 *MYO-6* 抑制胃癌的侵袭和转移^[4],而 miR-107 作用于抑癌基因 *DICER1* 促进胃癌转移^[5]。此外,miRNA 还可作为胃癌诊断和预后判断的生物标志物以及临床治疗的重要靶点^[6]。

miR-302c 属于 miR-302 家族中的一员,该家族最早在未分化胚胎干细胞中被发现和鉴定^[7]。目前的研究发现,miR-302c 在多种肿瘤如肝细胞癌^[8]、乳腺癌^[9]、胶质瘤^[10]中表达降低,并发挥抑癌作用,但是 miR-302c 在胃癌转移中的作用尚不明确。本研究拟探究 miR-302c 在胃癌细胞转移中的作用,并初步探寻其可能的分子机制,以期为胃癌转移的预测提供候选标志物,并为临床治疗转移性胃癌提供实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞系 SGC7901、MKN28、MKN45、AGS 和永生化的胃黏膜上皮细胞 GES-1 购自中国科学院上海细胞库,N87 细胞购自美国菌种保存中心(American type culture collection,ATCC),由本实验室保存。RPMI-1640 培养液、Opti-MEM 培养液、PBS 缓冲液、二抗(青霉素 100U/ml,链霉素 100U/ml)、含 0.02%EDTA 的 0.25%胰酶(美国 Gibco 公司);胎牛血清(美国 ZETA 公司);转染试剂 Lipofectamine™ RNAiMAX(美国 Invitrogen 公司);miR-302c mimic、inhibitor 及对应的 negative control、miR-302c 引物、CREB1 引物(广州锐博生物公司);miNeasy Mini Kit(德国 Qiagen 公司);PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(日本 TaKaRa 公司);Transwell 小室(未铺基质胶)(美国 Millipore 公司),Transwell 小室(含基质胶)(美国 Corning 公司);蛋白裂解液 RIPA、5×蛋白上样缓冲液(上海碧云天公司);蛋白酶抑制剂(美国 Roche 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司);兔单克隆抗体 β -actin(美国 Sigma 公司),兔单克隆抗体 CREB1、山羊抗兔二抗(美国 Cell Signalling 公司)。化学发光凝胶成像分析仪(美

国 Bio-Rad 公司),实时荧光定量 PCR 仪、酶标仪(美国 Bio-rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染

人胃癌细胞系和永生化的胃黏膜上皮细胞 GES-1 均用含 10%胎牛血清、1%二抗的 RPMI-1640 培养液于含 5%CO₂ 的 37℃培养箱中常规培养。消化细胞时使用含 0.02%EDTA 的 0.25%胰酶。转染前一天,常规消化细胞,接种于 6 孔板,待第二天细胞汇合度达到约 70%时根据转染试剂 Lipofectamine™ RNAiMAX 的说明进行转染,按 50nmol/L mimic/negative control、150nmol/L inhibitor/negative control、7.5 μ l 转染试剂制备混悬液,Opti-MEM 培养液替换常规培养液,常规培养箱培养 8h 后换为常规培养液。

1.2.2 RNA 提取和实时荧光定量反转录 PCR (RT-qPCR)

按照 RNA 提取试剂盒说明提取总 RNA 和 miRNA。反转录条件为:37℃反转录 1h,85℃灭活反转录酶 5min。反转录为 cDNA 后两步法进行扩增,扩增条件为 95℃预变性 30s;95℃变性 5s,60℃延伸 30s,40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算相对表达量,实验重复 3 次。

1.2.3 蛋白提取和 Western blot

转染 72h 后,收集细胞并用预冷的 PBS 清洗细胞两次,之后加入含 1%蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上裂解细胞 15min 后超声,4℃ 12 000r/min 离心 15min 后吸取上清,BCA 法进行蛋白定量,按照 1:4 的比例加入 5×蛋白上样缓冲液并 100℃变性 10min。每孔加入 20~30 μ g 的蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用半干转法使蛋白转至 NC 膜上,5%脱脂牛奶封闭 1.5h,再分别加入 β -actin(1:1000)、CREB1(1:1000)一抗 4℃摇床孵育过夜。TBST 洗涤条带 3 次,每次 5min,加入山羊抗兔的二抗(1:2000)室温摇床孵育 1h。TBST 洗涤 3 次,每次 5min,均匀滴加 ECL 发光液后用 Bio-Rad 凝胶成像仪显影。

1.2.4 Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力

转染 72h 后,常规消化细胞,用 PBS 洗涤 2 次,之后用不含血清的培养液重悬并计数。进行迁移实验时,使用不含基质胶的 Transwell 小室,小室置于含约 500 μ l 20%血清的完全培养液的 24 孔板中,上室加入含 1×10⁵ 个细胞的 200 μ l 细胞悬液,24 孔板

置于培养箱常规培养。进行侵袭实验时,使用含基质胶的小室,其余步骤同迁移实验。培养 48h 后,将小室取出,无水酒精固定细胞,用 0.1%的结晶紫对穿过小室孔膜的细胞进行染色,显微镜下观察拍照,并用 Image J 软件计数。

1.2.5 统计学分析

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。定量资料以均数±标准差表示,两组间比较用 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-302c 在胃癌细胞中的表达情况

RT-qPCR 检测 miR-302c 在永生化的正常胃黏膜细胞系 GES-1 和胃癌细胞系 MKN28、MKN45、SGC7901、AGS 和 N87 中的表达情况。结果显示,相对于 GES-1 而言,miR-302c 在被检测的胃癌细胞中表达降低(Figure 1)。

2.2 miR-302c 抑制胃癌细胞的迁移和侵袭

分别选取 miR-302c 高低表达的 SGC7901 和 AGS 细胞转染 miR-302c mimic 和 inhibitor,RT-qPCR 检测转染成功,差异具有统计学意义($P<0.001$)(Figure 2)。Transwell 实验表明,在 SGC7901 细胞中上调 miR-302c 后,SGC7901 细胞的迁移能力显著降低($t=3.024, P=0.039$),侵袭能力也显著降低($t=2.875, P=0.045$);在 AGS 细胞中下调 miR-302c 后,AGS 细胞的迁移能力显著升高($t=3.527, P=0.023$),侵袭能力也显著升高($t=3.204, P=0.032$)(Figure 3)。实验结果表明 miR-302c 对胃癌细胞的迁移和侵袭发挥抑制作用。

2.3 miR-302c 对 CREB1 的靶向作用

为进一步探究 miR-302c 抑制胃癌细胞转移的机制,我们通过生物信息学预测发现促转移分子 CREB1 是 miR-302c 的靶分子。我们首先检测了在 SGC7901 和 AGS 细胞中上下调 miR-302c 后,CREB1 的表达情况。上下调 miR-302c 后,CREB1 的 mRNA

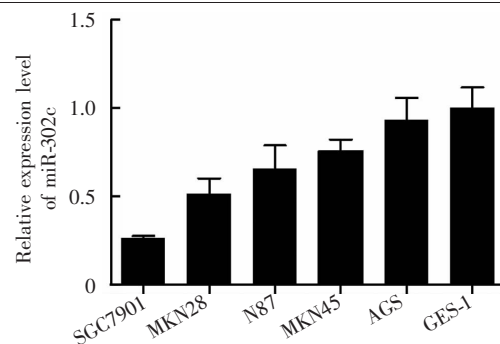
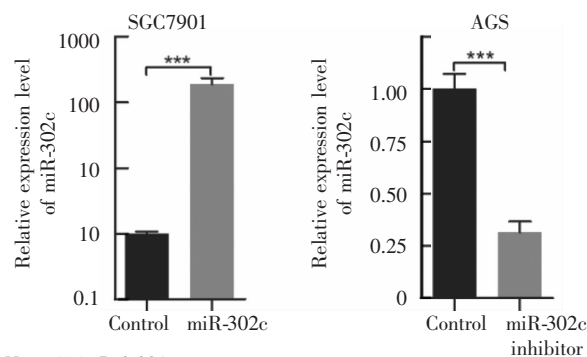
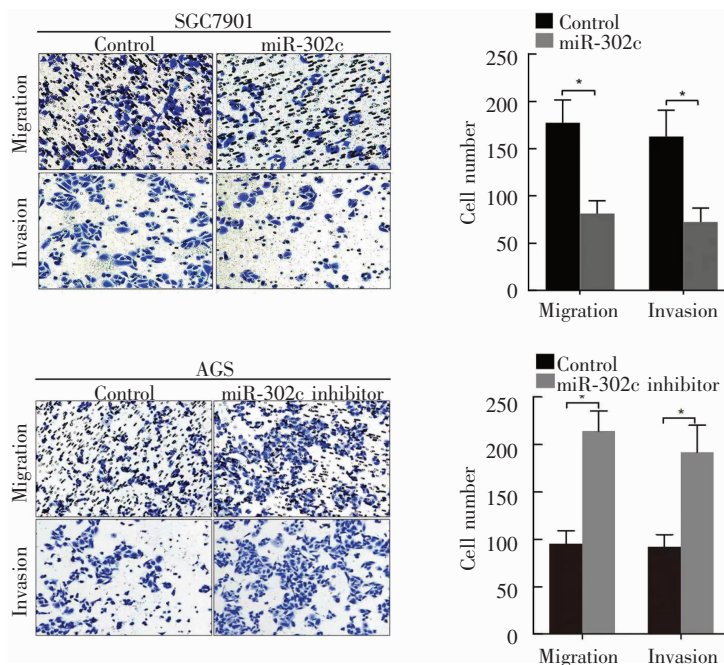


Figure 1 Expression of miR-302c in GC cells and immortalized gastric epithelial cell line detected by RT-qPCR



Note: ***, $P<0.001$.

Figure 2 RT-qPCR analysis of miR-302c expression after transfection of miR-302c mimic and inhibitor into SGC7901 and AGS cells



Note: *, $P<0.05$.

Figure 3 Influence of miR-302c on migration and invasion of GC cells

水平均未发生明显变化 ($P>0.05$)(Figure 4)。而 Western blot 结果显示,上调 miR-302c 后 CREB1 的蛋白表达明显降低,而下调 miR-302c 后 CREB1 的蛋白表达明显增加(Figure 5)。说明 miR-302c 抑制 CREB1 蛋白翻译,起到转录后调控的作用。

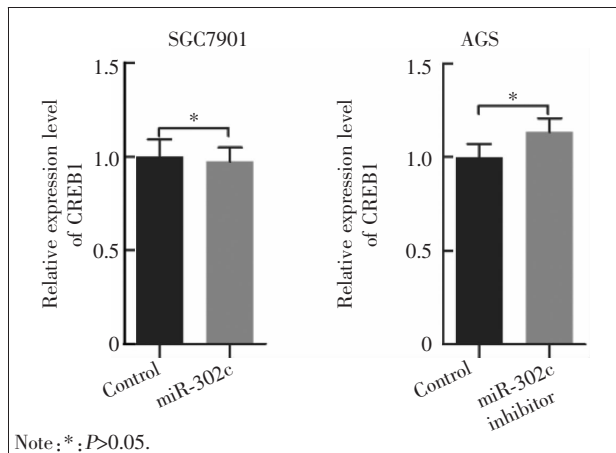


Figure 4 RT-qPCR analysis of CREB1 mRNA expression after transfection of miR-302c mimic or inhibitor in indicated cells

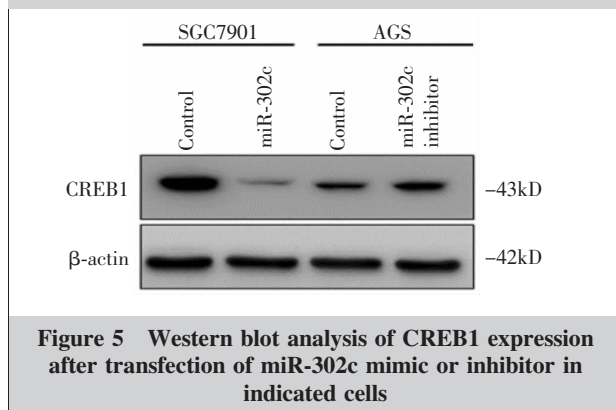


Figure 5 Western blot analysis of CREB1 expression after transfection of miR-302c mimic or inhibitor in indicated cells

2.4 miR-302c 通过下调 CREB1 抑制胃癌细胞的迁移和侵袭

为验证 CREB1 在 miR-302c 介导的抑制胃癌转移过程中的作用,我们在 SGC7901 中进行了功能挽救实验。与对照组相比,转染 miR-302c mimic 后 SGC7901 细胞的迁移能力明显降低 ($t=4.368, P=0.012$),侵袭能力明显降低 ($t=2.947, P=0.042$);而当转入 CREB1 质粒后,SGC7901 细胞的迁移能力得到部分恢复 ($t=3.437, P=0.026$),侵袭能力也得到部分恢复 ($t=2.984, P=0.041$)(Figure 6)。上述结果表明,miR-302c 通过下调 CREB1 抑制胃癌细胞的迁移和侵袭。

3 讨论

miRNA 是一类重要的非编码短链 RNA,它通过结合至靶基因的 3'端非翻译区抑制靶基因的表达或使其降解,在肿瘤的发生发展中起着重要的作用^[11]。在肿瘤转移中,miRNA 也扮演着重要角色,既可以作为癌基因也可以是抑癌基因^[12]。miR-302c 是 miR-302 家族中的一员,这个家族由 a/b/c/d 四个成员组成,现有的研究表明 miR-302c 在多种肿瘤中发挥抑癌作用^[7]。在肝细胞癌中,miR-302c 可以通过作用于肿瘤坏死因子受体相关因子 4 抑制肝癌细胞的迁移和侵袭,并且 miR-302c 在肝癌组织相较于癌旁组织明显低表达,低表达 miR-302c 与患者的不良预后相关^[8]。在子宫内膜癌中,miR-302c 抑制癌细胞的上皮间质转化并且促进细胞凋亡^[13]。在结肠癌中,miR-302c

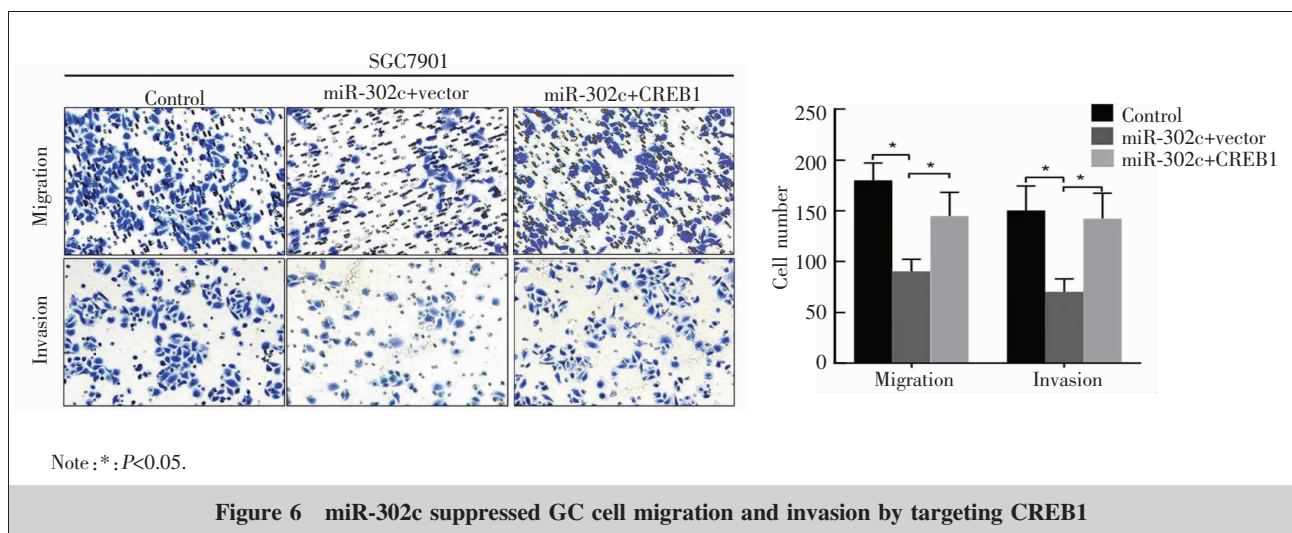


Figure 6 miR-302c suppressed GC cell migration and invasion by targeting CREB1

通过靶向转录因子 AP4 抑制结肠癌细胞的转移和上皮间质转化过程^[14]。本研究发现,miR-302c 在胃癌中也是低表达的,过表达 miR-302c 能显著抑制胃癌细胞的迁移和侵袭,与目前多数研究的结果一致。

环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 1(CREB1)是一种功能明确的促癌分子,它通过结合到目的基因启动子区的环腺苷酸反应元件调控下游分子的表达^[15]。大量的研究表明,CREB1 在多种肿瘤中高表达并且促进肿瘤的发生发展,例如乳腺癌、间皮瘤、卵巢癌和前列腺癌^[16]。在胃癌中,CREB1 促进胃癌细胞的增殖、侵袭和转移并且在胃癌组织中显著高表达^[17]。研究发现多种 miRNA 可以通过靶向 CREB1 发挥抑癌作用,例如 miR-506 通过抑制 CREB1 的表达抑制食管癌细胞的增殖^[18],miR-200b 抑制 CREB1 的表达抑制恶性胶质瘤细胞的增殖^[19],miR-122 通过靶向 CREB1 抑制胃癌细胞的增殖和侵袭等^[20]。本研究发现 CREB1 是 miR-302c 的下游靶基因,miR-302c 可以显著抑制 CREB1 的蛋白表达,功能挽救实验证明 miR-302c 对 CREB1 的靶向作用是其抑制胃癌转移的重要机制,这一结论进一步验证了 CREB1 在胃癌中的促癌作用。

综上所述,本实验发现 miR-302c 在胃癌中表达降低,上调 miR-302c 能显著抑制胃癌细胞的迁移和侵袭。初步探讨其机制发现,miR-302c 能靶向调控 CREB1 的表达。本研究结果可为探究 miRNA 在胃癌转移这一恶性表型中的作用提供新的理论依据。然而,对于 miR-302c 调控 CREB1 的具体机制,以及 miR-302c 在胃癌临床中的意义还有待下一步研究。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, et al. Gastric cancer [J]. Lancet, 2016, 388(10060): 2654-2664.
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
- [4] Lei C, Du Feng, Sun Lina, et al. miR-143 and miR-145 inhibit gastric cancer cell migration and metastasis by suppressing MYO6[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3101.
- [5] Li X, Zhang Y, Shi Y, et al. MicroRNA-107, an oncogene microRNA that regulates tumor invasion and metastasis by targeting DICER1 in gastric cancer [J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(9): 1887-1895.
- [6] Zhang Z, Li Z, Li Y, et al. MicroRNA and signaling pathways in gastric cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2014, 21(8): 305-316.
- [7] Gao Z, Zhu X, Dou Y. The miR-302/367 cluster: a comprehensive update on its evolution and functions [J]. Open Biol, 2015, 5(12): 150138.
- [8] Yang L, Guo Y, Liu X, et al. The tumor suppressive miR-302c-3p inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting TRAF4 [J]. J Cancer, 2018, 9(15): 2693-2701.
- [9] Leivonen SK, Makela R, Ostling P, et al. Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines [J]. Oncogene, 2009, 28(44): 3926-3936.
- [10] Wang Y, Wei Y, Tong H, et al. MiR-302c-3p suppresses invasion and proliferation of glioma cells via down-regulating metadherin (MTDH) expression [J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(9): 1308-1315.
- [11] Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review[J]. Embo Mol Med, 2012, 4(3): 143-159.
- [12] Zhang H, Li Y, Lai M. The microRNA network and tumor metastasis[J]. Oncogene, 2010, 29(7): 937-948.
- [13] Li Y, Huo J, Pan X, et al. MicroRNA 302b-3p/302c-3p/302d-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition and promotes apoptosis in human endometrial carcinoma cells [J]. Oncol Targets Ther, 2018, 11(3): 1275-1284.
- [14] Ma W, Liu B, Li J, et al. MicroRNA-302c represses epithelial-mesenchymal transition and metastasis by targeting transcription factor AP-4 in colorectal cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 105(1): 670-676.
- [15] Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(8): 599-609.
- [16] Conkright MD, Montminy M. CREB: the undicted cancer co-conspirator[J]. Trends Cell Biol, 2005, 15(9): 457-459.
- [17] Wang YW, Chen X, Gao JW, et al. High expression of cAMP-responsive element-binding protein 1 (CREB1) is associated with metastasis, tumor stage and poor outcome in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(12): 10646-10657.
- [18] Yao WJ, Wang YL, Lu JG, et al. MicroRNA-506 inhibits esophageal cancer cell proliferation via targeting CREB1 [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 10868-10874.
- [19] Peng B, Hu S, Jun Q, et al. MicroRNA-200b targets CREB1 and suppresses cell growth in human malignant glioma[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 379(1-2): 51-58.
- [20] Rao M, Zhu Y, Zhou Y, et al. MicroRNA-122 inhibits proliferation and invasion in gastric cancer by targeting CREB1[J]. Am J Cancer Res, 2017, 7(2): 323-333.