

miR-218-5p 靶向 N-cadherin 调节胃癌细胞迁移、侵袭分析

陈苏娟, 李瑞中

(盐城市第一人民医院肿瘤治疗中心, 江苏 盐城 224002)

摘要: [目的] 研究 miR-218-5p 靶向 N-钙黏蛋白(N-cadherin)调节胃癌细胞迁移、侵袭的作用及机制。[方法] 收集 28 例胃癌组织及癌旁组织, 检测 miR-218-5p 及 N-cadherin 的表达水平; 培养 MNK45 胃癌细胞, 分为转染阴性对照(NC) mimic 的 NC 组和转染 miR-218-5p mimic 的 miR-218-5p 组, 检测细胞的迁移及侵袭数目、N-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达水平、N-cadherin 双荧光素酶报告基因的荧光活力。[结果] 胃癌组织中 miR-218-5p 的表达水平 (0.45 ± 0.09) 显著低于癌旁组织的 (0.71 ± 0.22) ($P < 0.05$), N-cadherin 的表达水平 (0.93 ± 0.20) 显著高于癌旁组织的 (0.67 ± 0.14) ($P < 0.05$), 且 miR-218-5p 的表达水平与 N-cadherin 的表达水平呈负相关 ($r = -0.201$, $P < 0.05$)。miR-218-5p 组 MNK45 胃癌细胞的迁移数目 (65.57 ± 11.49) 及侵袭数目 (67.11 ± 10.34) 均少于 NC 组 (113.84 ± 20.13 , 98.72 ± 18.57 ; P 均 < 0.05), N-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达水平、野生型 N-cadherin 双荧光素酶报告基因的荧光活力低于 NC 组 ($P < 0.05$)。[结论] miR-218-5p 在胃癌中低表达, 过表达 miR-218-5p 能够抑制胃癌细胞的迁移和侵袭, 靶向抑制 N-cadherin 是可能的分子机制。

关键词: 胃肿瘤; miR-218-5p; N-cadherin; 迁移; 侵袭

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)08-0684-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.08.B005

MiR-218-5p Regulates Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells via Targeting N-Cadherin

CHEN Su-juan, LI Rui-zhong

(Yancheng First People's Hospital, Yancheng 224002, China)

Abstract: [Objective] To study the effect of miR-218-5p on regulating the migration and invasion of gastric cancer cells and its mechanism. [Methods] The cancer and adjacent tissue samples were collected from 28 gastric cancer patients. The expression levels of miR-218-5p and N-cadherin were measured. Gastric cancer MNK45 cells were transfected with miRNA mimic (NC group) or miR-218-5p (miR-218-5p group). The cell migration and invasion, expression levels of N-cadherin mRNA and protein, fluorescence activity of N-cadherin double luciferase reporter gene were measured. [Results] The expression level of miR-218-5p in gastric cancer was significantly lower than of paracancerous tissue (0.45 ± 0.09 vs 0.71 ± 0.22 , $P < 0.05$), and the expression level of N-cadherin was significantly higher than of paracancerous tissue (0.93 ± 0.20 vs 0.67 ± 0.14 , $P < 0.05$); the expression level of miR-218-5p was negatively correlated with the expression level of N-cadherin ($r = -0.201$, $P < 0.05$). The migrating (65.57 ± 11.49) and invading (67.11 ± 10.34) MNK45 cells in miR-218-5p group were less than those in NC group (113.84 ± 20.13 , 98.72 ± 18.57 , $P < 0.05$). The mRNA and protein expression level of N-cadherin, and the fluorescence activity of wild-type N-cadherin double fluorescence reporter gene in miR-218-5p group were lower than those of NC group ($P < 0.05$). [Conclusion] The expression level of miR-218-5p is low in gastric cancer. Overexpression of miR-218-5p can inhibit the migration and invasion of gastric cancer cells, which is associated with the inhibition of N-cadherin.

Subject words: gastric cancer; miR-218-5p; N-cadherin; migration; invasion

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤, 发病率

居我国恶性肿瘤第 2 位, 但早期胃癌临床症状不典型、诊断困难, 多数患者确诊时已经为中晚期, 预后较差、5 年生存率较低^[1-2]。目前, 胃癌的发病机制尚未明确, 不仅不利于发现早期诊断胃癌的标志物, 也

通信作者: 陈苏娟, 副主任医师, 硕士; 盐城市第一人民医院肿瘤治疗中心四病区, 江苏省盐城市亭湖区越河西路 14 号(224002); E-mail: chensujuan77@163.com

收稿日期: 2020-05-11; **修回日期:** 2020-06-17

不利于发现靶向治疗胃癌的手段。微小 RNA(miRNA, miR)是近些年恶性肿瘤发病机制的研究热点,能够在转录后水平调节原癌基因或抑癌基因表达,进而参与多种恶性肿瘤的发生发展。

多项胃癌的相关研究证实,miR-218-5p、miR-421、miR-29b等多种 miRs 在胃癌组织中异常表达^[3-4],其中 miR-218-5p 具有抑癌活性,已经被证实能够抑制肾癌、子宫内膜癌、宫颈癌的迁移、侵袭和转移^[5-7]。Sher 等^[8]在肺癌细胞研究了 miR-218-5p 发挥生物学作用的机制,结果发现 miR-218-5p 能够靶向抑制 N-钙黏蛋白(N-cadherin)的表达,进而抑制癌细胞迁移及侵袭。癌细胞过度迁移和侵袭是胃癌重要的病理特征,但目前 miR-218-5p 在胃癌迁移及侵袭中的调控作用及机制尚未明确。因此,本实验以 MKN45 胃癌细胞株为对象,探究了 miR-218-5p 靶向 N-cadherin 调节胃癌细胞迁移、侵袭的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 临床样本

收集 2017 年 2 月至 2019 年 5 月期间在盐城市第一人民医院手术切除的胃癌组织及对应的癌旁组织,共 28 例。纳入标准:(1)经病理学检查明确诊断为胃癌;(2)既往无其他恶性肿瘤病史;(3)术前未接受过放化疗等抗肿瘤治疗。

1.2 细胞

MKN45 胃癌细胞株购自上海纪宁实业公司,液氮中保存。

1.3 试剂

miR-218-5p mimic 及阴性对照(negative control, NC)mimic 购自上海吉玛公司,结晶紫购自 Sigma 公司,miR 提取分离试剂盒、miR cDNA 第一链合成试剂盒、miR 荧光定量检测试剂盒、培养细胞总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成预混试剂盒、荧光定量检测试剂盒购自北京天根公司,RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购自北京索莱宝公司,N-cadherin 一抗购自 Abcam 公司,含有 N-cadherin 基因 mRNA 3'UTR 的双荧光素酶报告基因及检测系统来自上海翊圣生物科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养及分组

MKN45 细胞复苏后在含有 10%胎牛血清的完

全培养基中贴壁培养,当细胞密度生长至 80%后用 0.25%胰蛋白酶进行消化并按 1:3 的比例传代。传代后的细胞进行分组,NC 组转染 NC mimic,miR-218-5p 组转染 miR-218-5p mimic,转染均按照 Lipofectamine3000 试剂的说明书进行操作。2 组细胞均连续转染 24h。

1.4.2 miR-218-5p 表达水平检测

取胃癌组织和癌旁组织,用 miR 提取试剂盒提取组织中的 miR,用 miRcDNA 第一链合成试剂盒将组织中的 miR 反转录为 cDNA,用 miR 荧光定量 PCR 检测试剂盒对 cDNA 进行 PCR 扩增,分别扩增 miR-218-5p 及内参 U6,根据试剂盒配置扩增体系并在 PCR 仪中按照 95℃ 15s 及 60℃ 34s 的循环重复 40 次,反应完成后在软件中生成循环阈值(Ct),以 U6 为内参,根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 miR-218-5p 表达水平。

1.4.3 N-cadherin mRNA 表达水平检测

取 NC 组和 miR-218-5p 组 MKN45 细胞,采用培养细胞总 RNA 提取试剂盒提取细胞中的 RNA,采用 cDNA 第一链合成预混试剂盒将细胞中的 RNA 反转录为 cDNA,采用荧光定量检测试剂盒对 cDNA 进行 PCR 扩增,分别扩增目的基因 N-cadherin 及内参基因 β -actin,根据试剂盒配置扩增体系并在 PCR 仪中按照 95℃ 15s 及 60℃ 34s 的循环重复 40 次,反应完成后在软件中生成循环阈值(Ct),根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 N-cadherin 的 mRNA 表达水平。

1.4.4 N-cadherin 蛋白表达水平检测

取胃癌组织和癌旁组织、NC 组和 miR-218-5p 组 MKN45 细胞,采用 RIPA 裂解液裂解组织或细胞并提取蛋白,采用 BCA 试剂盒检测蛋白含量后取 30 μ g 蛋白与上样缓冲液混合,在聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离、电转移至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1h,1:1000 稀释的 N-cadherin 一抗或 1:5000 稀释的 β -actin 一抗孵育 PVDF 膜过夜,1:2000 稀释的二抗室温孵育 PVDF 膜 1h,加入 ECL 显影液并在凝胶成像系统中显影得到 N-cadherin、 β -actin 的蛋白条带,计算 N-cadherin 与 β -actin 灰度值的比值(即 N-cadherin 的蛋白表达水平)。

1.4.5 细胞迁移及侵袭的 Transwell 检测

检测细胞迁移时,取转染后的 NC 组、miR-218-5p 组细胞,消化收集细胞,制成细胞悬液后接种在 Transwell 上室,同时在下室内加入含有 10%胎牛血

清的培养基,24h 后取出小室,擦去未发生迁移的细胞,用结晶紫染色后在显微镜高倍视野下观察,在 3 个随机视野下对迁移细胞进行计数。检测细胞侵袭时,预先在上室内加入基质胶,而后接种转染后的 MKN45 细胞并按照检测迁移的相同方法进行操作,对侵袭细胞进行计数。

1.4.6 miR-218-5p 靶向 N-cadherin 的生物信息学分析
在 Targetscan 网站中输入“miR-218-5p”,在靶基因列表中选择 N-cadherin,预测 N-cadherin 基因 mRNA 3'UTR 中 miR-218-5p 的结合位点。

1.4.7 双荧光素酶报告基因实验
将含有野生型 N-cadherin 基因 mRNA 3'UTR 的双荧光素酶报告基因或含有突变型 N-cadherin 基因 mRNA 3'UTR 的双荧光素酶报告基因转染进入 MKN45 细胞,同时转染 NC mimic 或 miR-218-5p mimic,24h 后采用双荧光素酶报告基因检测系统检测细胞中萤火虫及海肾的荧光活力,根据两个荧光活力的比值计算双荧光素酶报告基因的荧光活力。

1.5 统计学处理

采用 SPSS21.0 软件录入数据,计量资料以均数±标准差表示,两组间比较采用 t 检验,相关性分析采用 Pearson 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胃癌组织及癌旁组织中 miR-218-5p、N-cadherin 表达比较

与癌旁组织比较,胃癌组织中 miR-218-5p 的表达水平明显下调,N-cadherin 表达水平明显上调,差异有统计学意义(P<0.05)。相关性分析显示,胃癌组织中 miR-218-5p 表达水平与 N-cadherin 表达水平呈负相关 (r=-0.201、P<0.05) (Table 1)。

2.2 miR-218-5p mimic 的转染效果

NC 组胃癌细胞中 miR-218-5p 的表达水平为 0.69±0.10,miR-218-5p 组胃癌细胞中 miR-218-5p 的表达水平为 2.84±0.62。与 NC 组比较,miR-218-5p 组胃癌细胞中 miR-218-5p 的表达水平明显增加,差异有统计学意义(P<0.05)。

2.3 miR-218-5p 对胃癌细胞迁移、侵袭的调节作用
与 NC 组比较,miR-218-5p 组胃癌细胞的迁移数目、侵袭数目均明显减少,差异有统计学意义(P<0.05) (Figure 1、Table 2)。

2.4 miR-218-5p 对胃癌细胞中 N-cadherin 表达的调节作用

与 NC 组比较,miR-218-5p 组胃癌细胞中 N-cadherin 的 mRNA 表达水平及蛋白表达水平均明显下调,差异有统计学意义(P<0.05) (Figure 2、Table 3)。

2.5 miR-218-5p 靶向 N-cadherin 基因 mRNA 3'UTR
经 Targetscan 生物信息学分析,N-cadherin 基因 mRNA 3'UTR 中含有 miR-218-5p 的结合位点;经双

Table 1 Comparison of miR-218-5p,N-cadherin expression between gastric cancer and paracancerous tissues

Tissues	n	miR-218-5p	N-cadherin
Gastric cancer	28	0.45±0.09	0.93±0.20
Paracancerous	28	0.71±0.22	0.67±0.14
t	-	5.787	5.635
P	-	<0.001	<0.001

Table 2 Comparison of migrated and invaded gastric cells numbers between 2 groups

Groups	n	Migrated number	Invaded number
NC	5	113.84±20.13	98.72±18.57
miR-218-5p	5	65.57±11.49	67.11±10.34
t	-	4.657	3.325
P	-	0.002	0.010

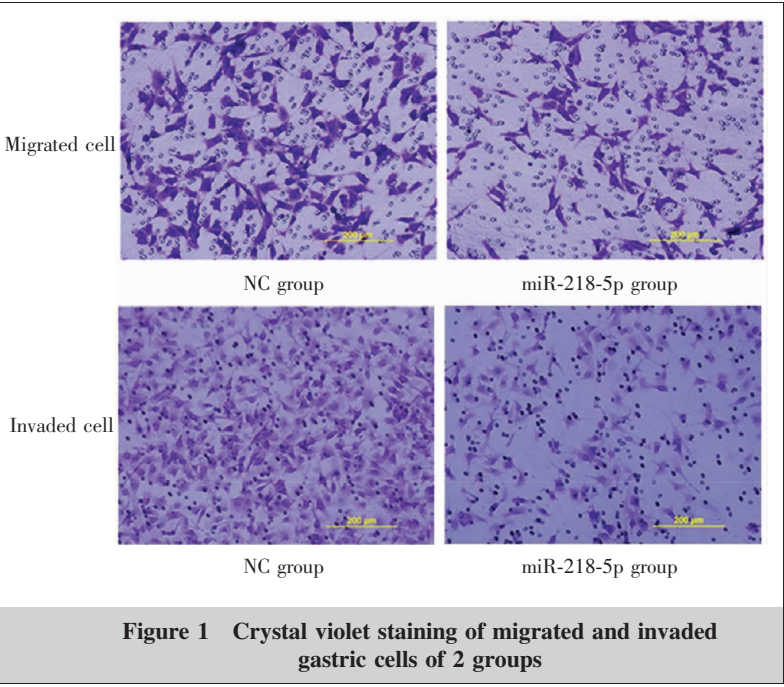


Figure 1 Crystal violet staining of migrated and invaded gastric cells of 2 groups

荧光素酶报告基因实验验证,与 NC 组比较,miR-218-5p 组胃癌细胞中含有野生型 *N-cadherin* 基因 mRNA 3'UTR 的双荧光素酶报告基因的荧光活力明显下降($P<0.05$)、含有突变型 *N-cadherin* 基因 miRNA 3'UTR 的双荧光素酶报告基因的荧光活力无明显变化($P>0.05$)(Figure 3、Table 4)。

3 讨 论

胃癌的发病涉及多基因、多环节、多步骤,但具体的分子机制仍未明确。近年,miRs 靶向调节原癌基因或抑癌基因表达是胃癌发病机制的研究热点。miR-218-5p 是一种具有抑癌作用的 miR,Zou 等^[9]研究发现,胃癌组织中 miR-218-5p 的表达减少且与远期复发有关;Ye 等^[10]的研究发现,结肠癌组织中 miR-218-5p 的表达减少且与病理特征恶化有关;Peng 等^[11]研究发现,前列腺癌患者血清中 miR-218-5p 的表达减少且与肿瘤骨转移有关。本实验也分析了胃癌组织中 miR-218-5p 表达变化,与癌旁组织比较,胃癌组织中 miR-218-5p 的表达明显减少,与 Zou 等^[9]的研究结果一致,表明 miR-218-5p 低表达可能削弱其抑癌作用并参与胃癌的发生发展,但 miR-218-5p 对胃癌生物学行为的调控作用仍需进一步研究。因此本研究在临床样本分析 miR-218-5p 表达变化的基础上以胃癌 MKN45 细胞株为实验对象,分析 miR-218-5p 的生物学作用。

肾癌、子宫内膜癌、宫颈癌的相关研究已经证实,miR-218-5p 抑制癌细胞的迁移、侵袭、转移^[5-7]。在胃癌的发生发展过程中,癌细胞过度的迁移、侵袭是重要的恶性生物学行为,能够促进癌细胞向周围淋巴结及远处脏器浸润,引起肿瘤转移^[12-13]。Xin 等^[14]在胃癌中的研究证实,外周血中 miR-218-5p 低表达与胃癌的转移有关,提示 miR-218-5p 可能参与胃癌迁移和侵袭的调控。本研究以 MKN45 细胞为实验对象,通过转染 miR-218-5p mimic 的方式增加细

Table 3 Comparison of N-cadherin expression in gastric cells between 2 groups

Groups	<i>n</i>	N-cadherin mRNA expression	N-cadherin protein expression
NC	5	0.85±0.20	0.77±0.18
miR-218-5p	5	0.52±0.09	0.30±0.09
<i>t</i>	—	3.365	5.222
<i>P</i>	—	0.010	0.001

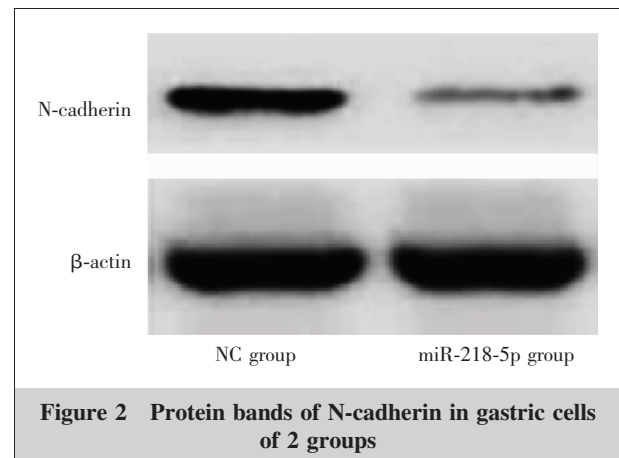
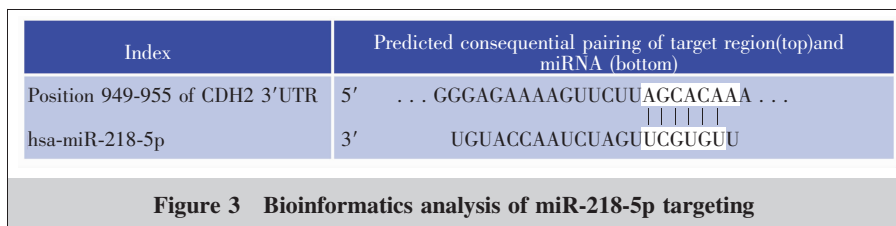


Table 4 Comparison of fluorescence activity of double luciferase reporter gene containing mRNA 3'UTR of N-cadherin gene between 2 groups

Groups	<i>n</i>	Wild type double luciferase reporter gene	Mutant type double luciferase reporter gene
NC	5	0.83±0.21	0.81±0.19
miR-218-5p	5	0.41±0.08	0.84±0.22
<i>t</i>	—	4.179	0.231
<i>P</i>	—	0.003	0.823



胞中 miR-218-5p 的表达,而后在 Transwell 中检测了细胞的迁移和侵袭,结果发现:增加 miR-218-5p 的表达后,细胞迁移和侵袭数目均明显减少,表明 miR-218-5p 对胃癌 MKN45 细胞的迁移和侵袭具有抑制作用,与既往研究报道的 miR-218-5p 在其他恶性肿瘤细胞中抑制迁移、侵袭的结果一致。

miR 发挥生物学作用的方式是在转录后水平调节基因表达,在靶基因 mRNA 的 3'UTR 上含有 miR 的结合位点,miR 与结合位点配对结合后促进 mRNA 降解、抑制 mRNA 翻译,最终实现抑制靶基因表

达的作用。肺癌中 miR-218-5p 靶基因的相关研究证实, N-cadherin 是 miR-218-5p 的靶基因。N-cadherin 是上皮间质转化过程中间质表型的标志基因, 能够降低细胞间的黏附性并促进细胞迁移、侵袭。已有研究报道, 胃癌中 N-cadherin 的表达明显增加, 过表达 N-cadherin 能够促进胃癌细胞的迁移和侵袭^[15-16]。本实验进一步在胃癌细胞中验证了 miR-218-5p 对 N-cadherin 的靶向调节作用。在转染 miR-218-5p mimic 后, MKN45 细胞中 N-cadherin 的表达水平明显降低, 同时含有野生型 N-cadherin 基因 mRNA 3' UTR 双荧光素酶报告基因的荧光活力也明显降低, 根据 Targetscan 预测结果对 N-cadherin 基因 mRNA 3' UTR 进行突变后, miR-218-5p 则不影响突变型双荧光素酶报告基因的荧光活力, 表明 miR-218-5p 能够靶向抑制 N-cadherin 的表达且靶向结合的位点与 Targetscan 预测的位点一致。

综上所述, miR-218-5p 在胃癌中低表达, 过表达 miR-218-5p 能够抑制胃癌细胞的迁移和侵袭, 同时也能抑制 N-cadherin 的表达, 靶向抑制 N-cadherin 可能是 miR-218-5p 抑制胃癌细胞迁移和侵袭的分子机制。

参考文献:

- [1] Casamayor M, Morlock R, Maeda H, et al. Targeted literature review of the global burden of gastric cancer [J]. *E-cancermedicallscience*, 2018, 12: 883.
- [2] Jia W, Chen P, Cheng Y. PRDX4 and its roles in various cancers [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2019, 1 (18): 1533033819864313.
- [3] Du ZP, Li HL, Liu CP, et al. Clinical significance and bioinformatics analysis of the depression of miR-218-5p in gastric cancer cells and gastric cancer tissue [J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2020, 17(7): 876-880. [杜正平, 李海龙, 刘春萍, 等. miR-218-5p 在胃癌细胞和胃癌组织中表达的临床意义及生物信息学分析 [J]. *检验医学与临床*, 2020, 17(7): 876-880.]
- [4] Kim YJ, Jeong S, Jung WY, et al. miRNAs as potential biomarkers for the progression of gastric cancer inhibit CREBZF and regulate migration of gastric adenocarcinoma cells [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(6): 693-701.
- [5] Wei R, Ye X, Zhao Y, et al. MicroRNA-218 inhibits the cell proliferation and migration in clear cell renal cell carcinoma through targeting cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(3): 3211-3218.
- [6] Li XC, Hai JJ, Tan YJ, et al. MiR-218 suppresses metastasis and invasion of endometrial cancer via negatively regulating ADD2 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(4): 1408-1417.
- [7] Xu Y, He Q, Lu Y, et al. MicroRNA-218-5p inhibits cell growth and metastasis in cervical cancer via LYN/NF- κ B signaling pathway [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 4(18): 198.
- [8] Sher YP, Wang LJ, Chuang LL, et al. ADAM9 up-regulates N-cadherin via miR-218 suppression in lung adenocarcinoma cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94065.
- [9] Zou J, Liao X, Zhang J, et al. Dysregulation of miR-195-5p/-218-5p/BIRC5 axis predicts a poor prognosis in patients with gastric cancer [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2019, 33(5): 1377-1385.
- [10] Ye Y, Gu B, Wang Y, et al. E2F1-mediated MNX1-AS1-miR-218-5p-SEC61A1 feedback loop contributes to the progression of colon adenocarcinoma [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 6145-6153.
- [11] Peng P, Chen T, Wang Q, et al. Decreased miR-218-5p levels as a serum biomarker in bone metastasis of prostate cancer [J]. *Oncol Res Treat*, 2019, 42(4): 165-185.
- [12] Gao X, Zhong S, Tong Y, et al. Alteration and prognostic values of collagen gene expression in patients with gastric cancer under different treatments [J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(3): 152831.
- [13] Gong Y, Wang P, Zhu Z, et al. Clinicopathological characteristics and prognosis of upper gastric cancer patients in China: a 32-year single-center retrospective clinical study [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2019, 2019: 9248394.
- [14] Xin SY, Feng XS, Zhou LQ, et al. Reduced expression of circulating microRNA-218 in gastric cancer and correlation with tumor invasion and prognosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(22): 6906-6911.
- [15] Xiao L, Huang CH, Yuan WJ, et al. Expressions of YAP1, E-cadherin and N-cadherin in gastric cancer tissue and their clinical significance [J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2018, 27(4): 442-448. [肖磊, 黄昌浩, 袁伟杰, 等. 胃癌组织 YAP1、E-cadherin、N-cadherin 表达及临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(4): 442-448.]
- [16] Li X, Qin XL, Ding M, et al. Overexpression of N-cadherin gene in lentiviral expression vector and establishment of stable cell lines [J]. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2017, 26(12): 1370-1372. [李想, 秦雪柳, 丁梅, 等. 过表达 N-cadherin 基因慢病毒表达载体的构建及稳定细胞株的建立 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2017, 26(12): 1370-1372.]