

罗敏,章帆,王利民,等. miR-219a-5p 在胃癌中的甲基化调控及生物学功能研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 66-73.

Luo M, Zhang F, Wang LM, et al. Methylated regulation and biological function of miR-219a-5p in gastric cancer [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 66-73.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.009

## miR-219a-5p 在胃癌中的甲基化调控及生物学功能研究

罗 敏\*, 章 帆, 王利民, 李红霞, 卿克勤

(成都市第一人民医院检验科, 成都 610000)

**【摘要】 目的** 检测 miR-219a-5p 在胃癌及其癌旁组织中的表达并分析其启动子区域甲基化水平, 探讨其对胃癌细胞系生物学功能的影响。**方法** 利用实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 和甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 方法检测胃癌及其癌旁组织中 miR-219a-5p 的表达及甲基化水平, 通过细胞增殖实验和流式细胞仪检测过表达 miR-219a-5p 后对胃癌细胞增殖和凋亡的影响; 体外细胞迁移和侵袭实验检测肿瘤细胞迁移和侵袭能力。**结果** miR-219a-5p 的表达水平在胃癌患者的癌组织中呈现普遍下调, miR-219a-5p 在癌组织中的相对表达量 ( $0.769 \pm 0.95$ ) 明显低于癌旁组织表达 ( $2.114 \pm 5.10$ ), 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 且 miR-219a-5p 表达下调组的 DNA 甲基化水平比表达上调组明显升高; 过表达 miR-219a-5p 的胃癌细胞系 MGC-803 细胞增殖能力和迁移侵袭能力明显受到抑制 ( $P < 0.05$ ), 过表达组凋亡比例明显增高 ( $P < 0.05$ ), 凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。**结论** miR-219a-5p 在胃癌组织中受甲基化调控普遍低表达, 且其具有抑制细胞增殖和迁移的能力, 促进细胞凋亡等类似抑癌基因的作用, 有望成为胃癌新的诊疗靶点。

**【关键词】** 胃癌; miR-219a-5p; 甲基化; 细胞凋亡; 迁移; 侵袭

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0066-08

## Methylated regulation and biological function of miR-219a-5p in gastric cancer

LUO Min\*, ZHANG Fan, WANG Limin, LI Hongxia, QING Keqin

(Department of Laboratory Medicine, Chengdu First People's Hospital, Chengdu 610000, China)

**【Abstract】 Objective** To assess miR-219a-5p expression and its promoter methylation level in gastric cancer and adjacent tissues, and to explore its effect on the biological functions of gastric cancer cell lines. **Methods** The expression and methylation level of miR-219a-5p in gastric cancer and adjacent tissues were detected by qPCR and MSP. Proliferation and apoptosis of gastric cancer cells were detected by Cell Counting Kit-8 assays and flow cytometry after overexpression of miR-219a-5p. **Results** MiR-219a-5p expression was generally downregulated in gastric cancer tissues. The relative expression of miR-219a-5p in cancer tissues ( $0.769 \pm 0.95$ ) was significantly lower than that in adjacent tissues ( $2.114 \pm 5.10$ ) ( $P < 0.05$ ). The DNA methylation level in the miR-219a-5p-downregulated group was significantly higher than that in the miR-219a-5p-upregulated group. Proliferation and invasion of MGC-803 cells overexpressing miR-219a-5p were inhibited significantly ( $P < 0.05$ ), apoptosis in the overexpression group was increased significantly ( $P < 0.05$ ), and expression of apoptosis-related protein caspase-3 was significantly higher ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** MiR-219a-5p is

[基金项目] 2020 年四川省卫生健康委员会科研课题 (20PJ188)。

[作者简介] 罗敏 (1985—), 女, 博士, 副主任技师, 研究方向: 微小 RNA 与胃癌相关基础和临床研究。E-mail: 326500084@qq.com

generally underexpressed by methylation in gastric cancer tissue, and inhibits cell proliferation and migration, promotes apoptosis, and play a role similar to tumor suppressor genes. It is expected to become a new target for diagnosis and treatment of gastric cancer.

【Keywords】 gastric cancer; miR-219a-5p; methylation; apoptosis; migration; invasion

胃癌是起源于胃黏膜上皮组织的恶性肿瘤,严重威胁人类健康。根据国际癌症研究机构 2020 年全球最新癌症数据显示:中国胃癌的发病人数约为 47.8 万(占全球 43.9%),死亡人数约为 37.3 万(占全球 48.6%),发病率和死亡率均位列第三位<sup>[1]</sup>。

胃癌患者的高死亡率主要是由于肿瘤的复发和转移,DNA 甲基化调控在胃癌的发生过程中具有重要意义<sup>[2]</sup>,而肿瘤相关的 microRNA 研究揭示出许多在肿瘤发生发展、耐药以及预后等方面起重要作用<sup>[3]</sup>。miR-219a-5p 已被报道在多种类型的肿瘤细胞中发挥重要调控作用;miR-219a-5p 抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭<sup>[4]</sup>;miR-219a-5p 上调抑制了黑色素瘤的生长和转移并增强了黑色素瘤细胞的化学敏感性<sup>[5]</sup>;miR-219a-5p 抑制上皮性卵巢癌细胞增殖,迁移和侵袭<sup>[6]</sup>;miR-219a-5p 增强胆囊癌进展<sup>[7]</sup>。但 miR-219a-5p 及其甲基化调控在胃癌的发生发展中的机制尚不清楚。本研究发现 miR-219a-5p 在胃癌患者组织中受甲基化调控而出现表达水平明显下调,通过体外实验进一步验证过表达 miR-219a-5p 后能明显抑制细胞增殖和迁移侵袭的能力,提示在胃癌发生发展过程中发挥抑癌基因的作用,为胃癌的诊治提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 细胞

人胃癌细胞株 MGC-803(中国医学科学院基础研究所细胞中心)。

#### 1.1.2 组织

胃癌组织及其相应癌旁组织共 110 例(均来自北京市肿瘤医院 2013~2016 年手术切除后冻存组织标本)。已通过成都市第一人民医院(成都市中西医结合医院)伦理审查(2020 年 KT 第 006 号)。

### 1.2 主要试剂与仪器

1640 培养基和胎牛血清(Hyclone 公司);荧光定量 PCR 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);Lipofectamine 2000 细胞转染试剂(Invitrogen 公司);miR-219a-5p-mimic(上海吉玛生物技术有限公司);亚硫酸氢盐转化试剂盒 EpiTect® Bisulfite kit

(Qiagen 公司,货号 58694I);兔抗人 P-caspase-3 抗体(Cell Signaling 公司,货号 8664L);CCK-8(Cell Counting Kit-8)(日本株式会社同仁化学研究所 Dojindo,货号 CK04);凋亡试剂盒 PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I(BD Biosciences 公司,货号 579563)。Transwell 小室(Minipore 公司,货号 PIMP12R48);荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad IQ5);流式细胞仪(美国 Coulter Flow c6)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实时荧光定量 RT-PCR

文中所有引物的设计均根据 Primer Premier 5 软件设计。miR-219a-5p 逆转录引物:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACAGAATT-3';U6 逆转录引物:5'-AAAATATGGAACGCTTCACGAATTTG-3';miR-219a-5p 定量 PCR 上游引物:5'-CAGCTGATTG TCCAAACGC-3';miR-219a-5p 定量 PCR 下游引物:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';U6 定量 PCR 上游引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3';U6 定量 PCR 下游引物:5'-ACGCTTCACGAATTT GCGTGTG-3'。定量 PCR 反应条件为:95℃ 5 min, 95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环,72℃ 10 min。均设复孔 3 个。IQ5 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 检测。利用 IQ5 自带分析软件导出相对表达值进行统计学分析。

#### 1.3.2 甲基化特异性 PCR 及甲基转移酶抑制剂 5' aza-2'-脱氧胞苷(5' AZa-CDR)处理细胞

提取肿瘤组织及癌旁组织 DNA,通过亚硫酸氢盐转化试剂盒处理后进行甲基化特异性 PCR。CPG 岛预测及甲基化引物设计利用在线软件 Methprimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) 及 Primer Premier 5 软件;甲基化上游引物:5'-TTGATTGTTTAAACGTAATTTTCGA-3';甲基化下游引物:5'-CTAAAAACACACCTAAATCCCCGAT-3';非甲基化上游引物:5'-TTGATTGTTTAAATGTAATT TTTGA-3';非甲基化下游引物:5'-CCTAAAAAC ACACCTAAATCCCCA-3'。甲基化特异性 PCR 采用 Touchdown PCR 的方法,反应条件如下:95℃ 5 min, 95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 40 s,每个循环降 0.6℃,

10 个循环后, 52℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环, 72℃ 10 min。用 5、15、30  $\mu\text{mol/L}$  的不同浓度梯度的 5' AZa-CDR 和组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素 A (TSA) 处理胃癌细胞 MGC-803 后, 分析处理前后 miR-219a-p 的表达变化情况。

### 1.3.3 细胞转染和分组处理

MGC-803 细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 1640 完全培养基, 37℃、5%  $\text{CO}_2$ 。将 MGC-803 细胞接种于 6 孔板, 待细胞融合度达到 70%~80% 时(贴壁 24 h 内), 脂质体转染方法: 每孔 100  $\mu\text{L}$  的无血清培养基中稀释 20  $\mu\text{L}$  mimic, 另外 100  $\mu\text{L}$  的无血清培养基中稀释 Lipofectamine 2000 转染试剂 3  $\mu\text{L}$ , 各静置 5 min 后混合再静置 20 min; 将上述混合液加入含细胞的 6 孔板中, 终体积为 1 mL 无血清无抗 1640 培养基, 6 h 后更换新鲜完全培养基 2 mL。转染后继续培养 48 h, 收获细胞提取 RNA 和蛋白质。把转染 control-mimic 和 miR-219a-5p-mimic 的胃癌细胞 MGC-803 命名为 control-mimic (对照组) 和 miR-219a-5p-mimic (miR-219a-5p 过表达组)。把没有转染的细胞命名为 un-treated (未处理组)。

### 1.3.4 组织标本与细胞总 RNA 提取

按 TRIzol 说明书操作提取组织或者细胞总 RNA。总 RNA 通过琼脂糖凝胶电泳法检测其完整性。

### 1.3.5 检测细胞增殖

取转染后 24 h 的 MGC-803 细胞, 重新铺于 96 孔板中, 相同实验组各设 4 个复孔。每孔铺 5000 个细胞, 分别设 0、24、36、48、72 h 5 个时间点, 检测 450 nm 与 630 nm 双波长下的光密度值 (optical density, OD), 制作时间增殖曲线, 所有操作均按 CCK-8 试剂盒说明书操作。

### 1.3.6 检测细胞凋亡

取转染后 48 h 的胃癌细胞系 MGC-803 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 用 Bind buffer 重悬, 经 PE Annexin V 和 7-Amino-actinomycin (7-AAD) 双染后 1 h 内送流式细胞仪检测。

### 1.3.7 Western blot 检测 p-caspase-3 蛋白的表达

提取细胞 (约  $1 \times 10^6$  个) 总蛋白, 并将 20  $\mu\text{g}$  总蛋白于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 中电泳并转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶室温封闭 2 h, 将膜封闭于含有相应一抗的抗体稀释液中 (1 : 1000), 4℃ 过夜。次日用 TBST (tris

buffered saline with 0.05% Tween-20) 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后加入相应的二抗 (1 : 1000), 室温温育 1 h, TBST 洗膜 3 次后显影。内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶重组蛋白 (recombinant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗 (1 : 2000), 二抗 (1 : 5000)。用增强化学发光法显色, X 光片曝光显影。

### 1.3.8 迁移和侵袭实验

接种细胞前 1 d 在 Transwell 小室上准备基质胶, 基质胶与预冷的无血清 1640 按 1 : 7 的比例以总量 32  $\mu\text{L}$  铺室面 (做肿瘤迁移实验则不需要此步); 取不含血清的培养液制备单细胞悬液 (每毫升  $2.5 \times 10^5$  个) 400  $\mu\text{L}$  加入上室中; 在下室即 24 孔板内加入 600  $\mu\text{L}$  含 20% FBS 的 1640 培养液。将 24 孔板置于 37℃、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱内, 培养 24 h 后用湿棉签擦去膜上面未穿过膜的细胞, 无水乙醇固定 20 min 后结晶紫染色, 染色完毕后将小室自然风干, 用手术刀片沿压痕将小室膜轻轻切下, 置于载玻片上在显微镜下观察、计数。

## 1.4 统计学方法

应用 SPSS 20.0 软件进行数据统计, 实验数据以平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 各组均数通过方差齐性检验后, 两组间的比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-219a-5p 在胃癌组织及其癌旁组织中的差异表达

通过实时荧光定量 PCR 我们分析了 110 例胃癌患者癌组织 (C) 及癌旁组织 (N) 标本中的表达情况, 数据用  $\text{Log}1.5$  (C/N) 表示, 有 72 例患者 miR-219a-5p 的表达水平在癌组织中低于癌旁组织, 另外 38 例患者表达上调 (见图 1A)。miR-219a-5p 在癌组织中的表达值为 ( $0.769 \pm 0.95$ ), 癌旁组织表达值为 ( $2.114 \pm 5.10$ ), 差异具有统计学意义 ( $P = 0.0063$ ) (见图 1B)。

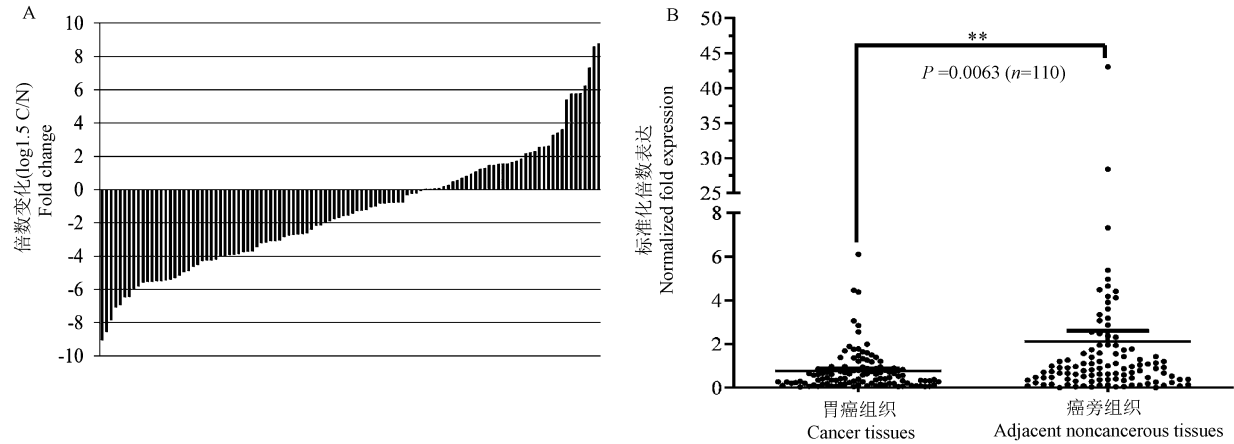
### 2.2 miR-219a-5p 在胃癌组织中的表达与临床病理分期分型的相关性

本研究分析了 110 例胃癌患者中 miR-219a-5p 的表达与临床病理因素之间的相关性, 其表达与年龄性别等无统计学差异, 与临床病理分型及分期有一定的相关性, miR-219a-5p 的表达随着肿瘤分期的增加而进一步降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

2.3 miR-219a-5p 的表达受表观遗传学调控

为了明确 miR-219a-5p 在胃癌细胞中表达下调

的原因,本研究首先进行生物信息学分析,利用 MethPrimer 软件预测 miR-219a-5p 上游区域的 CpG



注:A: 患者 miR-219a-5p 在癌组织中的相对下调表达比例;B: miR-219a-5p 在癌组织及癌旁组织中的表达值分布情况。与癌旁组织相比, \*\*  $P<0.01$ 。

图 1 miR-219a-5p 在胃癌组织及其癌旁组织中的表达情况

Note. A, Relative down-regulated expression ratio of miR-219a-5p in cancer tissues of patients. B, Distribution of expression values of miR-219a-5p in cancer tissues and adjacent tissues. Compared with adjacent noncancerous tissues group, \*\*  $P<0.01$ .

Figure 1 Expression of miR-219a-5p in gastric cancer tissues and adjacent tissues

表 1 miR-219a-5p 表达和胃癌患者临床病理特征的关系 ( $n=110$ )

Table 1 Relationship between miR-219a-5p expression and clinicopathological characteristics of gastric cancer patients

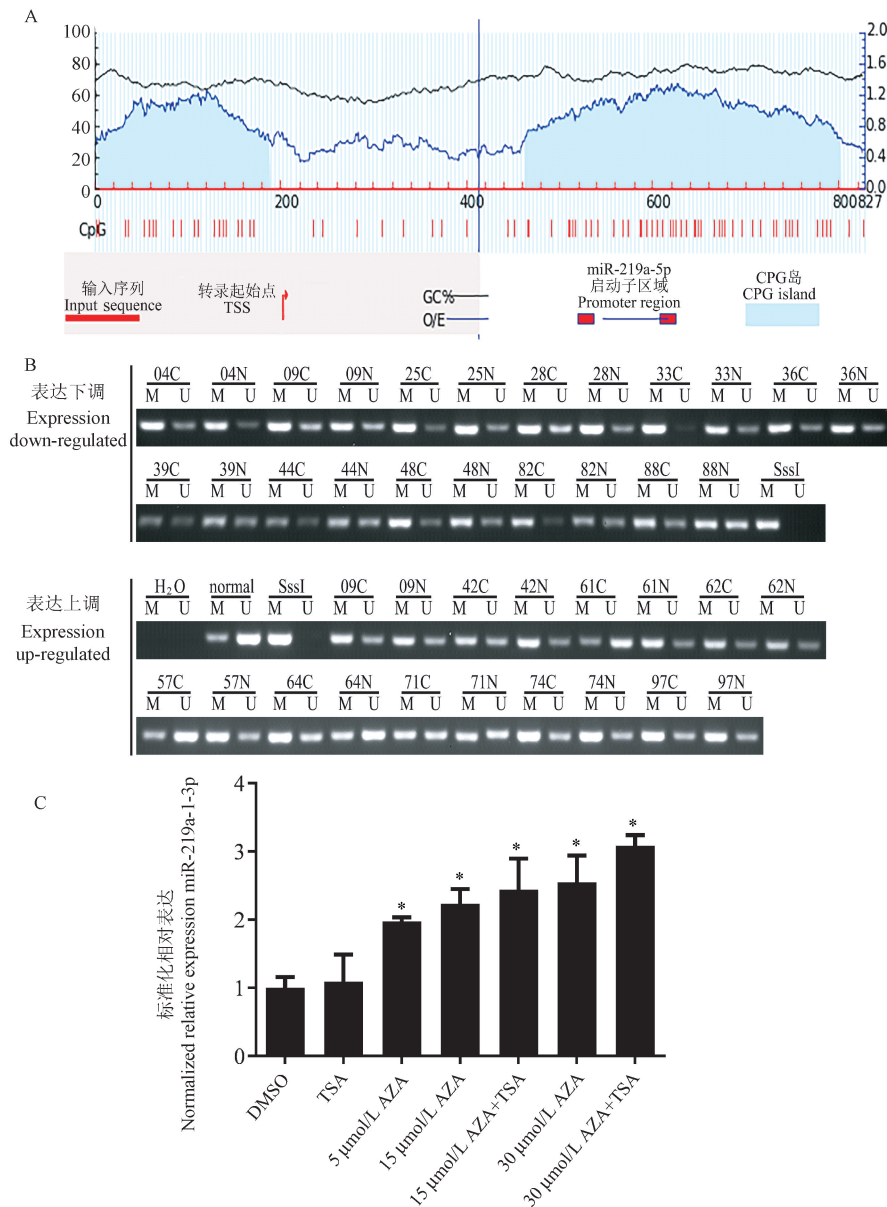
| 因素<br>Factors            | 分组<br>Groups         | <i>n</i> | 均值<br>Mean <sup>1</sup> | 标准差<br>SD <sup>2</sup> | <i>P</i> 值<br><i>P</i> value |
|--------------------------|----------------------|----------|-------------------------|------------------------|------------------------------|
| 性别<br>Gender             | 男 Male               | 89       | -1.3559                 | 3.6584                 | 0.9065                       |
|                          | 女 Female             | 21       | -1.2511                 | 3.7186                 |                              |
| 年龄<br>Age                | ≥60                  | 56       | -1.7334                 | 3.5676                 | 0.2470                       |
|                          | < 60                 | 54       | -0.9237                 | 3.7277                 |                              |
| 静脉侵犯<br>Venous invasion  | 无 Negative           | 64       | -1.2228                 | 3.5708                 | 0.7036                       |
|                          | 有 Positive           | 46       | -1.4932                 | 3.7985                 |                              |
| 位置<br>Position           | 贲门<br>Cardia         | 49       | -1.4717                 | 3.1356                 | 0.8966                       |
|                          | 胃体<br>Gastric body   | 26       | -1.0553                 | 4.7255                 |                              |
|                          | 胃窦<br>Gastric antrum | 35       | -1.3541                 | 3.5204                 |                              |
| 博尔曼分型<br>Borrmann typing | 隆起 I                 | 11       | 1.4512                  | 4.9640                 | 0.0240 *                     |
|                          | 溃疡 II                | 82       | -1.7246                 | 3.2519                 |                              |
|                          | 浸润 III+IV            | 17       | -1.2645                 | 3.9816                 |                              |
| T 分期<br>pT stage         | T1+T2                | 11       | 1.5235                  | 3.8569                 | 0.0057 *                     |
|                          | T3+T4                | 99       | -1.6536                 | 3.5078                 |                              |
| N 分期<br>pN stage         | N0+N1                | 76       | -1.6741                 | 3.2433                 | 0.1474                       |
|                          | N2+N3                | 34       | -0.5799                 | 4.3951                 |                              |
| M 分期<br>pM stage         | M0                   | 98       | -1.4956                 | 3.4445                 | 0.1915                       |
|                          | M1                   | 12       | -0.0318                 | 5.0522                 |                              |
| TNM 分期<br>pTNM stage     | I + II               | 29       | -1.1776                 | 3.5948                 | 0.7871                       |
|                          | III + IV             | 81       | -1.3925                 | 3.6941                 |                              |

注: <sup>1</sup>:  $\text{Log}_{1.5}(\text{C}/\text{N})$  的均数; <sup>2</sup>:  $\text{Log}_{1.5}(\text{C}/\text{N})$  的标准差。博尔曼分型和 T 分期组间比较, \*  $P<0.05$ 。

Note. <sup>1</sup>, Mean of  $\text{Log}_{1.5}(\text{C}/\text{N})$ . <sup>2</sup>, Standard Definition of  $\text{Log}_{1.5}(\text{C}/\text{N})$ . Compared between groups of Borman classification and T staging, \*  $P<0.05$ .

岛(图 2A)。采用 MSP 检测 11 对 miR-219a-5p 表达下调组和 9 对表达上调组的胃癌组织和癌旁组织中 miR-219a-5p 的甲基化状态。本研究发现 miR-219a-5p 基因启动子区域的高甲基化比例在 miR-219a-5p 表达下调组(72.7%, 8/11)比表达上调组的甲基化

比例(55.6%, 5/9)更高(图 2B)。此外, MGC-803 经 5' AZa-CDR 处理后, miR-219a-5p 的表达上调(图 2C), TSA 的联合处理排除无其他表观遗传调控的影响。综上所述, 这些数据表明, miR-219a-5p 在胃癌中由于上游区域甲基化而表达下调。



注: A: MiR-219a-5p 上游区域的 CpG 岛; B: MiR-219a-5p 基因启动子区域的甲基化情况; C: MGC-803 细胞经 5' AZa-CDR 处理后 miR-219a-5p 的表达情况。DMSO: 二甲基亚砜; AZA: 5-氮杂-2-脱氧胞嘧啶(5' AZa-CDR); TSA: 组蛋白脱乙酰酶抑制剂 TSA; C: 癌组织; N: 癌旁组织; M: 甲基化引物 PCR 产物; U: 未甲基化引物 PCR 产物。与 DMSO 处理组相比, \*  $P < 0.05$ 。

**图 2** miR-219a-5p 的表达受甲基化表观遗传学调控

Note. A, CpG island in the upstream region of miR-219a-5p. B, Methylation in the promoter region of miR-219a-5p gene. C, Expression of miR-219a-5p in MGC-803 cells treated with 5' AZa-CDR. DMSO, Dimethyl sulfoxide. AZA, 5-aza-2-deoxycytidine (5' AZa-CDR). TSA, Histone deacetylase Trichostatin A. C, Cancer tissues. N, Adjacent noncancerous tissues. M, Methylated primer PCR product. U, Unmethylated primer PCR product. Compared with DMSO treatment group, \*  $P < 0.05$ .

**Figure 2** Expression of miR-219a-5p is regulated by methylation epigenetics

## 2.4 过表达 miR-219a-5p 抑制胃癌细胞 MGC-803 的增殖能力

通过脂质体转染模拟体 mimic 使 MGC-803 细胞过表达成功,过表达组 miR-219a-5p 表达水平升高近 9583 倍,见图 3A。CCK-8 结果显示,与未处理组(un-treated)和对照组(control-mimic)相比,过表达组(miR-219a-5p-mimic)的细胞增殖能力明显受到抑制,72 h 时间点的 CCK-8 检测值( $OD_{450}$  和  $OD_{630}$ )分别是(1.83±0.02)、(1.78±0.02)、(1.18±0.06),差异具有统计学意义( $P<0.001$ ) (见图 3B)。

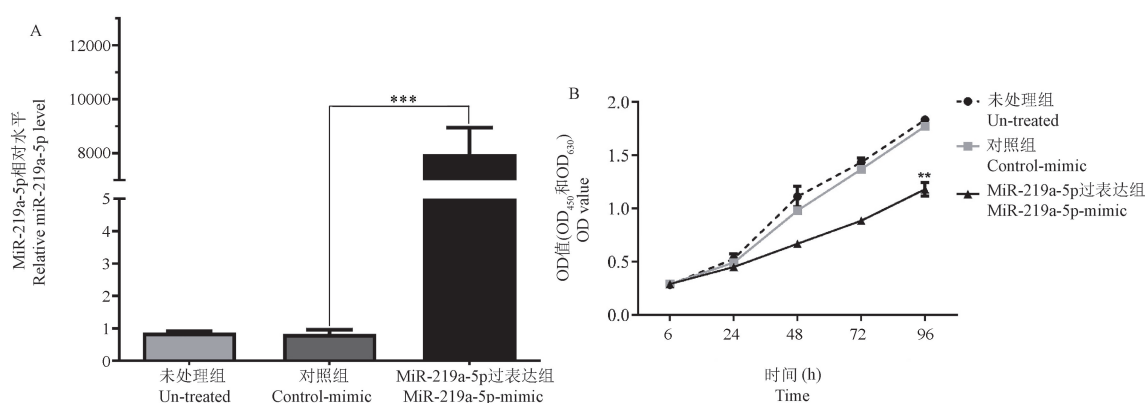
## 2.5 过表达 miR-219a-5p 促进胃癌细胞 MGC-803 的凋亡

流式细胞仪结果显示,与 un-treated 组和 control-mimic 组相比,miR-219a-5p 过表达组 MGC-803 细胞

的凋亡比例明显增加,见图 4A 所示,control-mimic 组与 miR-219a-5p 过表达组的早期凋亡比例分别是(26.6±0.94)%和(51.6±1.74)%,晚期凋亡比例分别是(11.3±1.21)%和(9.6±0.95)%,早期凋亡率明显增高( $P<0.05$ )。Western blot 结果显示,MGC-803 细胞转染 miR-219a-5p-mimic 48 h 后,凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达水平明显比对照组的表达水平高,GAPDH 为内参,见图 4B。

## 2.6 过表达 miR-219a-5p 抑制胃癌细胞 MGC-803 迁移和侵袭能力

图 5A、5B 所示,Transwell 小室迁移实验结果显示,过表达 miR-219a-5p 组高倍镜每视野平均穿膜细胞数明显少于 un-treated 组和 control-mimic 组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。图 5A、5C 所示,在



注:A: MGC-803 细胞转染 mimic 后 miR-219a-5p 过表达成功;B: miR-219a-5p 过表达后抑制 MGC-803 细胞的增殖。与对照组相比,\*\*\*  $P<0.001$ 。

图 3 miR-219a-5p 过表达后对 MGC-803 细胞增殖的影响

Note. A, Overexpression of miR-219a-5p successfully transfected mimic into MGC-803 cells. B, Overexpression of miR-219a-5p inhibited the proliferation of MGC-803 cells. Compared with control-mimic group, \*\*\*  $P<0.001$ .

Figure 3 Effect of miR-219a-5p overexpression on the proliferation of MGC-803 cells

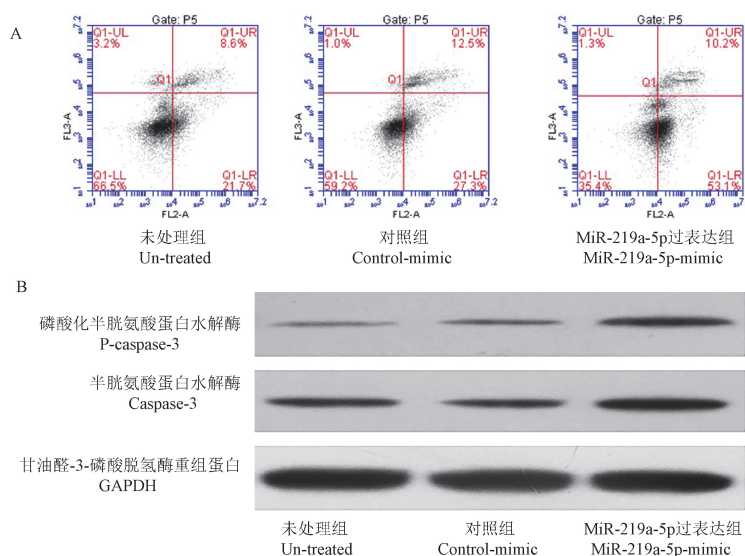
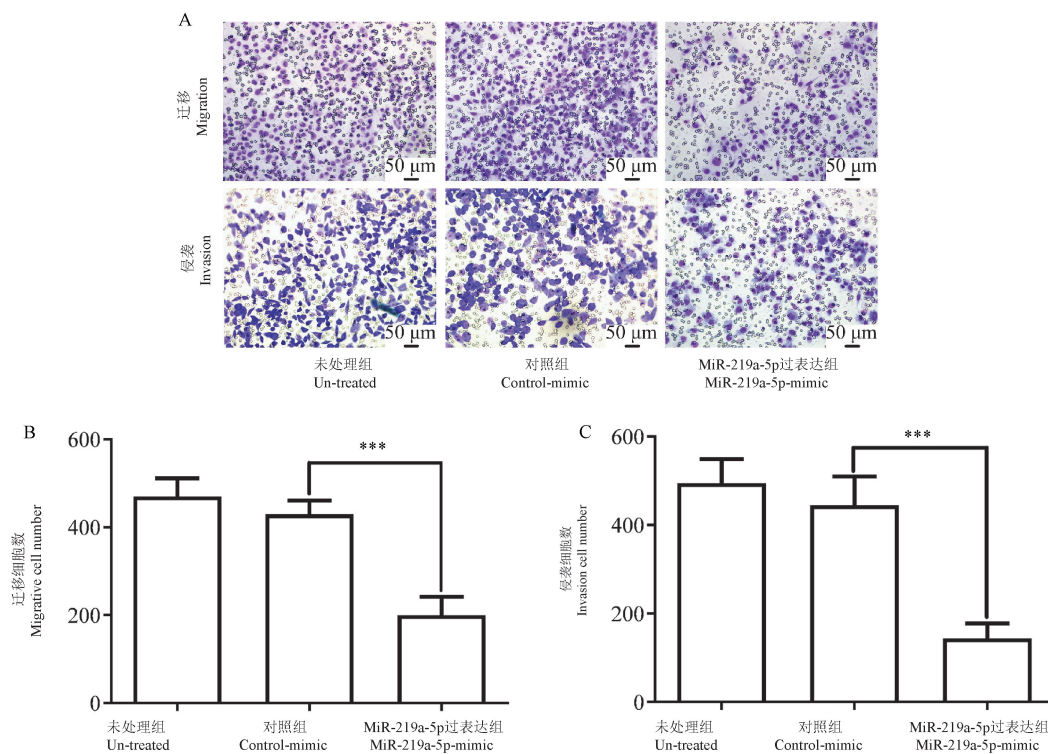


图 4 MiR-219a-5p 过表达后对 MGC-803 细胞凋亡的影响

Figure 4 Effect of miR-219a-5p overexpression on MGC-803 cell apoptosis



注:A: MiR-219a-5p 过表达后抑制 MGC-803 细胞的迁移和侵袭;B: 3 组高倍镜每视野平均穿膜细胞数。与对照组相比,  $^*P<0.05$ 。

图 5 MiR-219a-5p 过表达后对 MGC-803 细胞迁移和侵袭能力的影响

Note. A, Overexpression of miR-219a-5p inhibited the migration and invasion ability of MGC-803 cells. B, The average number of transmembrane cells per field of view of the three groups of high magnification. Compared with control-mimic group,  $^*P<0.05$ .

Figure 5 Effect of miR-219a-5p overexpression on the migration and invasion ability of MGC-803 cells

有基质胶的 transwell 小室侵袭实验发现,miR-219a-5p 过表达组高倍镜每视野平均穿膜细胞数同样明显少于 un-treated 组和 control-mimic 组,差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。以上实验表明,miR-219a-5p 能减弱胃癌细胞的迁移和侵袭能力。

### 3 讨论

胃癌患者发病一般无明显症状,常与胃炎、胃溃疡等胃慢性疾病症状相似,由于缺乏有效的早期诊断的肿瘤分子标志物,大多数胃癌患者确诊时已是进展期,而患者预后高度依赖肿瘤临床分期,早期胃癌患者术后 5 年生存率可达 90%,而进展期胃癌的 5 年生存率却低于 30%<sup>[8]</sup>,可见胃癌的及时诊断和预后评估对于优化治疗策略至关重要,传统的各种血清抗原标志物如癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 19-9(CA19-9)、胃蛋白酶原(PG)等的检测仅通常被用作表明癌症风险的特征<sup>[9-10]</sup>。因此,寻找胃癌新的肿瘤分子标志物是临床对胃癌精准诊疗的迫切需求。miRNA 通过对靶 mRNA 的降解或翻译抑制,从而发挥其对靶基因表达的转录后调控作用,

在肿瘤进展和转移过程中发挥重要的调节作用<sup>[11-12]</sup>。Li 等<sup>[13]</sup>研究发现血清 miR-17-92 能很好的区分早期胃癌患者和健康对照组,具有致癌潜力,其中 miR-20a-5p 在诊断胃癌时受试者工作特征曲线下面积(AUC)较高,大于 0.95,敏感性和特异性均大于 90%,可见 miRNA 可以很好的作为胃癌诊断的潜在分子标志物。

在本研究中,通过实时荧光定量 PCR 方法手段发现 miR-219a-5p 在胃癌患者癌组织中呈现普遍低表达情况,本课题组下一步研究计划就是收集胃癌患者血清标本,检测血清标本中 miR-219a-5p 的含量,分析是否能为筛选胃癌早期诊断标志物提供参考价值。为了探索 miR-219a-5p 为什么会出现癌组织表达下调,我们分析了 miR-219a-5p 所跨越的基因组启动子区域序列,利用 MethPrimer 在线软件(<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>)我们发现存在 CpG 岛,miRNA 表达的失调是癌症的发生、发展的重要特征,miRNA 的表达具有组织和时空特异性,并受到表观遗传机制调控,CpG 岛的高甲基化具有沉默基因表达的作用<sup>[14]</sup>。miR-320a

在胃癌组织中受 DNA 甲基化调控,在癌组织中表达普遍下调,并可抑制肿瘤进展<sup>[15]</sup>。我们的实验结果也提示在胃癌组织中显著低表达的 miR-219a-5p 很可能受甲基化的表观遗传调控。同时我们发现 miR-219a-5p 的表达随着肿瘤恶性程度的增加而降低,研究结果表明其表达的改变可能在胃癌的进展中扮演一定角色。

miRNA 在胃癌治疗、监测复发和判断预后方面也有着广阔的应用前景,多项研究表明 miRNA 与胃癌的转移、复发和耐药等紧密相关<sup>[16-18]</sup>。本研究利用模拟体 miR-219a-5p-mimic,在胃癌细胞系 MGC-803 中成功过表达 miR-219a-5p 后,可明显抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,并促进凋亡,这说明了 miR-219a-5p 可能是胃癌发生发展过程中一种重要的抑癌 miRNA,调控胃癌细胞增殖、凋亡、转移等生物特性过程,虽然具体机制还有待进一步研究,但为临床治疗胃癌提供了新的靶点。Wang 等<sup>[17]</sup>报道 miR-454 在胃癌组织和细胞系中显著下调,miR-454 的低表达与淋巴结转移、浸润深度和 TNM 分期呈正相关,并提出 miR-454 可能负调控结合丝裂原活化蛋白激酶 1 而在胃癌中发挥抑癌基因作用,抑制胃癌细胞的增殖和侵袭,诱导了细胞的凋亡。由此可见,miRNA 作为基因的重要调控因子,可望成为胃癌精准治疗的最有前景的新靶点。

Ji 等<sup>[18]</sup>研究发现 miR-374a-5p 在胃癌患者血清中明显高表达且与患者进展及预后不良相关,且装载了 miR-374a-5p 抑制剂的外泌体能够逆转奥沙利铂体内抗性,显著抑制肿瘤的生长,这些发现提示,体外抗 miR-374a-5p 可能是一种潜在的胃癌耐药治疗方法,也说明利用外泌体的转运功能以及较好生物相容性的特性在治疗肿瘤中显示出优势,这将为 miRNA 靶向治疗开拓一片广阔领域。如果将目的 miRNA 装载至外泌体过表达抑癌基因,其抑制肿瘤活性的效果可能将更明显<sup>[19]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Cao XY, Ma HX, Shang YH, et al. DNA methyltransferase3a expression is an independent poor prognostic indicator in gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(25): 8201-8208.
- [3] 阮庆芬, 杨德祥, 杨理伟. miR-572 对胃癌细胞增殖和凋亡影响及其作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 82-88.
- [4] Ye Q, Wang X, Yuan M, et al. MiR-219-5p targets TBXT and inhibits breast cancer cell EMT and cell migration and invasion [J]. Biosci Rep, 2021, 41(8): 1-11.
- [5] Long J, Menggen Q, Wuren Q, et al. MiR-219-5p inhibits the growth and metastasis of malignant melanoma by targeting bcl-2 [J]. Biomed Res Int, 2017, 813(2017): 9032502-9032509.
- [6] Wei C, Zhang X, He S, et al. Microrna-219-5p inhibits the proliferation, migration, and invasion of epithelial ovarian cancer cells by targeting the Twist/Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. Gene, 2017, 12(637): 25-32.
- [7] Wang P, Zhou C, Li D, et al. CircMTO1 sponges microRNA-219a-5p to enhance gallbladder cancer progression via the TGF- $\beta$ /Smad and EGFR pathways [J]. Oncol Lett, 2021, 22(1): 563.
- [8] Strong VE, Wu AW, Selby LV, et al. Differences in gastric cancer survival between the U. S. and China [J]. J Surg Oncol, 2015, 112(1): 31-37.
- [9] Huang RJ, Hwang JH. Improving the early diagnosis of gastric cancer [J]. Gastrointest Endosc Clin N Am, 2021, 31(3): 503-517.
- [10] Xia Y, Hu X, Di K, et al. Combined detection of exosome concentration and tumor markers in gastric cancer [J]. J Biomed Nanotechnol, 2020, 16(2): 252-258.
- [11] Cortez MA, Anfossi S, Ramapriyan R, et al. Role of miRNAs in immune responses and immunotherapy in cancer [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2019, 58(4): 244-253.
- [12] Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. Dev Biol, 2007, 302(1): 1-12.
- [13] Li H, Wu Q, Li T, et al. The miR-17-92 cluster as a potential biomarker for the early diagnosis of gastric cancer: evidence and literature review [J]. Oncotarget, 2017, 8(28): 45060-45071.
- [14] Davalos V, Esteller M. MicroRNAs and cancer epigenetics: a macroevolution [J]. Curr Opin Oncol, 2010, 22(1): 35-45.
- [15] Li YS, Zou Y, Dai DQ. MicroRNA-320a suppresses tumor progression by targeting PBX3 in gastric cancer and is downregulated by DNA methylation [J]. World J Gastrointest Oncol, 2019, 11(10): 842-856.
- [16] Zhang J, Ren J, Hao S, et al. MiRNA-491-5p inhibits cell proliferation, invasion and migration via targeting JMJD2B and serves as a potential biomarker in gastric cancer [J]. Am J Transl Res, 2018, 10(2): 525-534.
- [17] Wang X, Liu B, Wen F, et al. MicroRNA-454 inhibits the malignant biological behaviours of gastric cancer cells by directly targeting mitogen-activated protein kinase 1 [J]. Oncol Rep, 2018, 39(3): 1494-1504.
- [18] Ji R, Zhang X, Gu H, et al. MiR-374a-5p: A new target for diagnosis and drug resistance therapy in gastric cancer [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 12(18): 320-331.
- [19] Elewally MI, Elsergany AR. Emerging role of exosomes and exosomal microRNA in cancer: pathophysiology and clinical potential [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2021, 147(3): 637-648.

[收稿日期] 2021-11-12