

本文引用:夏云展,李荣振,杨金花,等. MicroRNA-218 靶向神经元表达发育下调基因 9 对胃癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. 新乡医学院学报, 2020, 37(3): 219-224. DOI:10. 7683/xyxyxb. 2020. 03. 005.

### 【基础研究】

## MicroRNA-218 靶向神经元表达发育下调基因 9 对胃癌细胞增殖和侵袭的影响

夏云展<sup>1</sup>, 李荣振<sup>1</sup>, 杨金花<sup>2</sup>, 李 琼<sup>3</sup>

(1. 郑州人民医院普通外科, 河南 郑州 450000; 2. 郑州人民医院病理科, 河南 郑州 450000; 3. 郑州人民医院神经内科, 河南 郑州 450000)

**摘要:** 目的 观察 microRNA-218 (miR-218) 对胃癌细胞 SGC-7901 增殖和侵袭的影响,并探讨其作用机制。  
**方法** 体外培养人胃癌细胞 SGC-7901,将对数生长期细胞分为空白对照组、阴性对照组和 miR-218 mimics 组,阴性对照组和 miR-218 mimics 组细胞分别转染阴性对照序列和 miR-218 mimics,空白对照组细胞不进行转染。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测 3 组细胞中 miR-218 表达,细胞计数试剂盒-8 检测 3 组细胞培养 24、48、72、96 h 时的增殖活性;平板细胞克隆形成实验检测 3 组细胞克隆能力;Transwell 实验检测 3 组细胞侵袭能力;Western blot 法检测 3 组细胞中神经元表达发育下调基因 9 (NEDD9) 蛋白、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、波形蛋白 (vimentin)、神经型钙黏附蛋白 (N-cadherin) 的表达。将 SGC-7901 细胞分为阴性对照组 + NEDD9 3'非编码区 (3'UTR)-Wt 组 (阴性对照序列、pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Wt 共转入 SGC-7901 细胞)、miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR-Wt 组 (miR-218 mimics、pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Wt 共转入 SGC-7901 细胞)、阴性对照组 + NEDD9 3'UTR-Mut 组 (阴性对照序列、pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Mut 共转入 SGC-7901 细胞)、miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR-Mut 组 (miR-218 mimics、pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Mut 共转入 SGC-7901 细胞),常规培养 48 h 后收集各组细胞,采用发光检测仪测定各组细胞中荧光素酶活性,分析 miR-218 与 NEDD9 的靶向关系。**结果** 与空白对照组和阴性对照组比较,miR-218 mimics 组细胞中 miR-218 表达及培养 24、48、72、96 h 时细胞增殖抑制率显著升高 ( $P < 0.05$ ),NEDD9 蛋白表达及细胞克隆形成数量和侵袭细胞数量显著减少 ( $P < 0.05$ );空白对照组与阴性对照组细胞中以上各指标比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR-Wt 组细胞中荧光素酶活性显著低于阴性对照组 + NEDD9 3'UTR-Wt 组、阴性对照组 + NEDD9 3'UTR-Mut 组和 miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR-Mut 组 ( $P < 0.05$ )。与空白对照组和阴性对照组比较,miR-218 mimics 组细胞中 E-cadherin 蛋白表达显著升高,vimentin、N-cadherin 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。空白对照组与阴性对照组细胞中 E-cadherin、vimentin、N-cadherin 蛋白表达比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论** miR-218 过表达胃癌细胞 SGC-7901 中 NEDD9 蛋白表达显著下调,microRNA-218 可能通过靶向下调 NEDD9 表达而抑制 SGC-7901 细胞的增殖及侵袭能力。

**关键词:** 胃癌;增殖;侵袭;microRNA-218;神经元表达发育下调基因9

中图分类号:R735.2 文献标志码:A 文章编号:1004-7239(2020)03-0219-06

## Effect of microRNA-218 targeting neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 9 on the proliferation and invasion of gastric cancer cells

XIA Yunzhan<sup>1</sup>, LI Rongzhen<sup>1</sup>, YANG Jinhua<sup>2</sup>, LI Qiong<sup>3</sup>

(1. Department of General Surgery, the People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, Henan Province, China; 2. Department of Pathology, the People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, Henan Province, China; 3. Department of Neurology, the People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, Henan Province, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of microRNA-218 (miR-218) on the proliferation and invasion of gastric cancer cell line SGC-7901, and explore its mechanism. **Methods** Human gastric cancer cell line SGC-7901 cells were cultured *in vitro*. The logarithmic growth phase cells were divided into blank control group, negative control group and miR-218 mimics group. The cells in the negative control group and miR-218 mimics group were transfected with negative control sequence and miR-218 mimics respectively; the cells in the blank control group were not transfected. After transfection, the expression of miR-218 in the three group was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; the proliferation activity of cells in the three group was detected by cell counting kit-8 assay at 24, 48, 72, 96 h after cultured; the cloning ability of cells in the three group was detected by plate cell clone formation assay; the invasion ability of cells in the

DOI:10.7683/xxvxyxb.2020.03.005

收稿日期:2019-10-11

基金项目:2018 年度河南省科技攻关项目(编号:182102310355)

作者简介:夏云展(1981-),男,河南泌阳人,硕士,副主任医师,研究方向:胃肠肿瘤。

three group was detected by Transwell assay. The expressions of neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 9 (NEDD9), E-cadherin, vimentin and N-cadherin were detected by Western blot. The SGC-7901 cells were divided into negative control group + NEDD9 3' untranslated coding regions (3'UTR)-Wt group (the negative control sequence and pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Wt were co transferred into SGC-7901 cells), miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR-Wt group (miR-218 mimics and pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Wt were co transferred into SGC-7901 cells), negative control group + NEDD9 3'UTR -Mut group (the negative control sequence and pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Mut were co transferred into SGC-7901 cells) and miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR -Mut group (the miR-218 mimics and pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Mut were co-transferred into SGC-7901 cells), after 48 hours of conventional culture, the cells in each group were collected, and the luciferase activity of the cells in each group was measured by light-emitting detector to analyze the targeting relationship between miR-218 and NEDD9.

**Results** Compared with the blank control group and the negative control group, the expression of miR-218, the cell proliferation inhibition rate at 24, 48, 72, 96 hours after cultured in the miR-218 mimics group were significantly increased ( $P < 0.05$ ); the expression of NEDD9, the number of cell clones and invasive cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ); there was no significant difference in the above indicators between the blank control group and the negative control group ( $P > 0.05$ ). Compared with the negative control group + NEDD9 3'UTR-Wt group, the luciferase activity in the miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR-Wt group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the blank control group and the negative control group, the expression of E-cadherin protein in miR-218 mimics group was significantly increased, while the expression of vimentin and N-cadherin protein was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the expression of E-cadherin, vimentin and N-cadherin between the blank control group and the negative control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The expression of NEDD9 protein is significantly down-regulated in miR-218-overexpressed gastric cancer SGC-7901 cells. MiR-218 may inhibit the proliferation and invasion of SGC-7901 cells by targeting down-regulation of NEDD9.

**Key words:** gastric cancer; proliferation; invasion; microRNA-218; neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 9

胃癌属于消化系统恶性肿瘤,其发病率在所有恶性肿瘤中居第4位,病死率居第2位,严重威胁患者生命。胃癌的治疗方法主要包括手术联合化学治疗、放射治疗及综合治疗<sup>[1]</sup>。胃癌的发生机制较复杂,其中多种蛋白、抑癌基因、致癌基因等参与了胃癌的发生、发展过程。微RNA (microRNA, miRNA) 属于19~25 bp的非编码小分子RNA,参与细胞增殖、分化、凋亡等生命过程,miRNA表达失调可能引起肿瘤等疾病的发生<sup>[2-3]</sup>。miR-218属于miRNA之一,研究发现,miR-218在胃癌中呈低表达,过表达miR-218可抑制胃癌细胞增殖<sup>[4]</sup>,但其具体作用机制尚不清楚。本研究通过体外培养SGC-7901细胞,转染过表达miR-218序列,探究其对胃癌细胞增殖、侵袭的影响及可能的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验细胞** 人胃癌细胞SGC-7901购于中国科学院上海细胞研究所,细胞采用含体积分数10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的RPMI-1640培养基于37℃、含体积分数5%CO<sub>2</sub>的培养箱内培养,传代培养至第3代后用于研究。

**1.2 主要试剂与仪器** RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司,细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自上海翊圣生物科技有限公司, Lipofectamine™2000细胞转染试剂盒、Trizol试剂购自美

国Invitrogen公司,放射免疫沉淀分析 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白检测试剂盒购自上海碧云天生物技术研究,兔抗人神经元表达发育下调基因9(neural precursor cell expressed developmentally downregulated 9, NEDD9)、E-钙黏附蛋白(E-cadherin) 抗体购自英国Abcam公司,兔抗人波形蛋白(vimentin)、神经型钙黏附蛋白(neural cadherin, N-cadherin) 抗体购自美国CST公司, FBS、山羊抗兔辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记二抗购自美国Sigma公司,反转录试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒、Thermal Cycler Dice 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪购自日本Takara公司, GloMax 20/20 发光检测仪购自美国Promega公司, DSZ-70PHC 型光学显微镜购自日本Carton公司, 680 酶标仪、Mini-PROTEAN Tetra 垂直电泳仪购自美国Bio-Rad公司。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞转染** 收集对数生长期细胞,加入25 g·L<sup>-1</sup>胰蛋白酶消化细胞,将细胞接种于6孔板,每孔1×10<sup>6</sup>个细胞。当细胞融合达80%以上后将培养液替换为不含FBS的培养液,采用Lipofectamine™2000试剂盒将阴性对照序列、miR-218 mimics分别转染至SGC-7901细胞,设为阴性对照组、miR-218 mimics组,另设置不进行转染的细胞作为空白

对照组,每组设6个复孔,实验重复3次,培养6h后将培养液更换为含体积分数10% FBS的培养液,常规培养48h后收集细胞进行后续实验。

1.3.2 实时荧光定量 PCR (quantitative real time PCR,qRT-PCR)检测胃癌细胞中 miR-218 表达

收集各组转染后培养48h细胞,采用Trizol法提取细胞总RNA,利用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,配制PCR反应体系:SYBR4® Premix Ex Taq™ 10 μL,cDNA模板2 μL,上、下游引物各0.6 μL,灭菌ddH<sub>2</sub>O 6.8 μL。PCR反应程序:95℃ 60 s;95℃ 30 s,60℃ 30 s,40个循环。以U6作为内参,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法定量分析miR-218相对表达量。

1.3.3 CCK-8法检测细胞增殖活性 收集各组转染后培养48h细胞,消化后制备单细胞悬液,接种于96孔板,每孔1.0×10<sup>5</sup>个细胞,各组细胞继续培养24、48、72、96h后添加20 μL CCK-8工作液,置于培养箱内继续孵育4h,采用酶标仪检测450 nm波长处各组细胞吸光度值,实验重复3次,取均值。细胞增殖抑制率=(1-实验组吸光度值/空白对照组吸光度值)×100%。

1.3.4 平板细胞克隆形成实验检测细胞克隆能力

取各组转染后培养48h细胞,胰蛋白酶消化,接种于60 mm培养皿中,每个培养皿中1 000个细胞,同时加入3 mL细胞培养基,置于培养箱内培养2周,肉眼观察到单个细胞克隆团后加入磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS)清洗,添加甲醛,置于-4℃冰箱中固定30 min,PBS清洗后添加结晶紫染液,室温下染色20 min,PBS清洗后拍照记录细胞克隆数量。

1.3.5 Transwell实验检测细胞侵袭能力 在Transwell小室的上室底部内铺基质胶,37℃孵育2h,置于超净台中紫外线照射30 min灭菌。收集各组对数生长期细胞,以无血清培养基制备单细胞悬液,细胞浓度调整为5×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>,取200 μL细胞悬液加入上室,下室添加600 μL含体积分数20% FBS的培养基,置于细胞培养箱内培养24 h,取出上室,擦去上室底部内侧未迁移细胞,置于40 g·L<sup>-1</sup>多聚甲醛中固定15 min,结晶紫染色20 min,用棉签擦掉上室水分,显微镜下随机选取5个视野,统计穿膜细胞数量,重复3次,取均值。

1.3.6 双荧光素酶活性实验检测 miR-218 与 NEDD9 的靶向关系 构建野生型(Wt)NEDD9 3'非编码区(3' untranslated coding regions,3'UTR)、突变型(Mut)NEDD9 3'UTR 荧光素酶报告基因表达载体pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Wt 和 pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Mut,将SGC-7901细胞分为阴性对照组 +

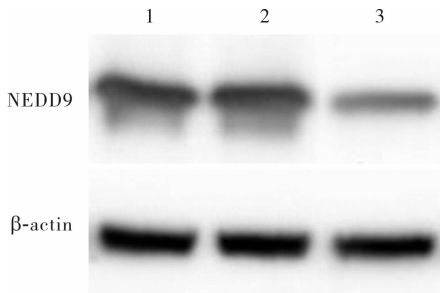
NEDD9 3'UTR-Wt组(将阴性对照序列、pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Wt共转入SGC-7901细胞)、miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR-Wt组(将miR-218 mimics、pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Wt共转入SGC-7901细胞)、阴性对照组 + NEDD9 3'UTR-Mut组(将阴性对照序列、pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Mut共转入SGC-7901细胞)、miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR-Mut组(将miR-218 mimics、pCHECK2-NEDD9 3'UTR-Mut共转入SGC-7901细胞),常规培养48h后收集各组细胞,采用发光检测仪测定细胞荧光素酶活性。

1.3.7 Western blot法检测细胞中 NEDD9 蛋白表达 收集各组转染后培养48h细胞,采用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA法检测蛋白含量,取30 μg蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转移至硝酸纤维素膜上,添加50 g·L<sup>-1</sup>脱脂牛奶进行封闭,1h后添加NEDD9、E-cadherin、vimentin、N-cadherin和β-actin一抗稀释液(1:1 000),4℃条件下振荡过夜,室温下加入二抗(1:5 000)孵育2h,清洗后加入化学发光显色液,曝光后应用Image-J软件分析各蛋白条带灰度,计算各目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学处理 应用SPSS 22.0软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用q检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 miR-218 对胃癌细胞中 miR-218 及 NEDD9 蛋白表达的影响 结果见图1和表1。与空白对照组和阴性对照组比较,miR-218 mimics组细胞中miR-218表达显著升高,NEDD9蛋白表达显著降低,差异均有统计学意义(P<0.05)。空白对照组与阴性对照组细胞中miR-218及NEDD9蛋白表达比较差异无统计学意义(P>0.05)。



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:miR-218 mimics组。  
图1 3组细胞中NEDD9蛋白表达(Western blot)  
Fig.1 Expression of NEDD9 protein in cells in the three groups(Western blot)

表 1 3 组细胞中 miR-218 及 NEDD9 蛋白表达比较

Tab.1 Comparison of the expression of miR-218 and NEDD9 protein among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	miR-218	NEDD9 蛋白
空白对照组	6	1.05 ± 0.13	0.93 ± 0.23
阴性对照组	6	1.08 ± 0.16	0.95 ± 0.12
miR-218 mimics 组	6	1.79 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.06 <sup>a</sup>

注:与空白对照组和阴性对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

2.2 过表达 miR-218 对胃癌细胞增殖的影响 结果见表 2。miR-218 mimics 组细胞培养 24、48、72、96 h 时细胞增殖抑制率均显著高于空白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。空白对照组与阴性对照组各时间点细胞增殖抑制率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 3 组细胞增殖抑制率比较

Tab.2 Comparison of the inhibition rate of cell proliferation among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	细胞增殖抑制率/%			
		24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组	6	0.36 ± 0.04	0.28 ± 0.06	0.34 ± 0.08	0.42 ± 0.09
阴性对照组	6	0.47 ± 0.06	0.39 ± 0.07	0.45 ± 0.06	0.46 ± 0.08
miR-218 mimics 组	6	12.27 ± 2.36 <sup>a</sup>	20.74 ± 3.15 <sup>a</sup>	32.84 ± 6.48 <sup>a</sup>	40.23 ± 6.15 <sup>a</sup>

注:与空白对照组和阴性对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

2.3 过表达 miR-218 对胃癌细胞克隆能力和侵袭能力的影响 结果见图 2、图 3 和表 3。与空白对照组和阴性对照组比较,miR-218 mimics 组细胞克隆形成数量和侵袭细胞数量均显著减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。空白对照组与阴性对照组细胞克隆形成数量和侵袭细胞数量比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

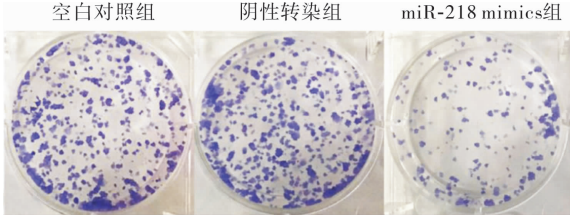


图 2 3 组细胞克隆形成数量

Fig.2 The number of cell clone formation in the three groups

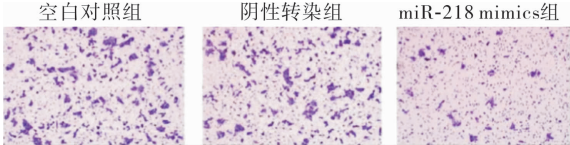


图 3 3 组细胞侵袭能力(结晶紫染色, ×400)

Fig.3 Invasiveness of cells in the three groups( crystal violet staining, ×400)

表 3 3 组细胞克隆数量及侵袭细胞数量比较

Tab.3 Comparison of the number of cell clones and invasive cells among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	细胞克隆数量	侵袭细胞数量
空白对照组	6	230.07 ± 22.29	203.59 ± 28.42
阴性对照组	6	238.54 ± 23.72	211.28 ± 29.51
miR-218 mimics 组	6	91.11 ± 15.08 <sup>a</sup>	92.73 ± 13.34 <sup>a</sup>

注:与空白对照组和阴性对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

2.4 双荧光素酶活性检测 NEDD9 3'UTR 与 miR-218 的靶向关系 结果见图 4。TargetScan 预测显示,在 NEDD9 mRNA 的 3'UTR 中存在 miR-218 结合位点。阴性对照组 + NEDD9 3'UTR-Wt 组、miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR-Wt 组、阴性对照组 + NEDD9 3'UTR-Mut 组、miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR-Mut 组细胞荧光素酶活性分别为  $1.03 \pm 0.02$ 、 $0.27 \pm 0.04$ 、 $1.01 \pm 0.06$ 、 $0.98 \pm 0.09$ ; miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR-Wt 组荧光素酶活性显著低于阴性对照组 + NEDD9 3'UTR-Wt 组、阴性对照组 + NEDD9 3'UTR-Mut 组和 miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR-Mut 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

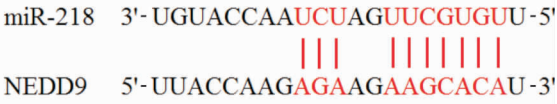
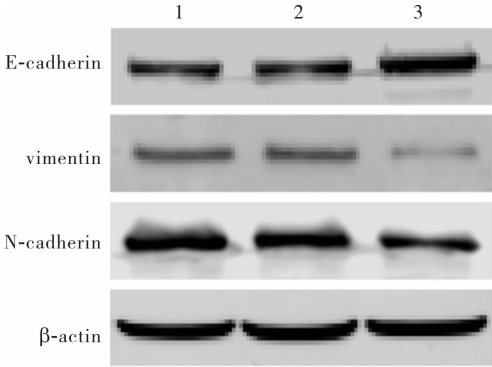


图 4 TargetScan 预测 NEDD9 3'UTR 与 miR-218 的靶向结合位点

Fig.4 Binding-site between NEDD9 3'UTR and miR-218 predicted by TargetScan

2.5 过表达 miR-218 对胃癌细胞中 E-cadherin、vimentin 及 N-cadherin 蛋白表达的影响 结果见图 5 和表 4。与空白对照组和阴性对照组比较,miR-218 mimics 组细胞中 E-cadherin 蛋白表达显著升高,vimentin、N-cadherin 蛋白表达显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。空白对照组与阴性对照组细胞中 E-cadherin、vimentin、N-cadherin 蛋白表达比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:miR-218 mimics 组。

图 5 3 组细胞中 E-cadherin、vimentin、N-cadherin 蛋白表达(Western blot)

Fig.5 Expression of E-cadherin,vimentin and N-cadherin protein in cells in the three groups(Western blot)

表 4 3 组细胞中 E-cadherin、vimentin 及 N-cadherin 蛋白表达比较

Tab.4 Comparison of the expression of E-cadherin,vimentin and N-cadherin protein among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	E-cadherin 蛋白	vimentin 蛋白	N-cadherin 蛋白
空白对照组	6	0.75 ± 0.12	0.68 ± 0.09	1.28 ± 0.14
阴性对照组	6	0.79 ± 0.09	0.64 ± 0.08	1.24 ± 0.12
miR-218 mimics 组	6	1.16 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.06 <sup>a</sup>

注:与空白对照组和阴性对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

miRNA 是具有 22 个寡核苷酸的非编码 RNA,其通过与靶基因 mRNA UTR 互补配对结合而使靶基因降解,阻碍靶基因翻译,特异调控靶基因 mRNA 表达。miRNA 通过调节致癌基因或抑癌基因进而发挥致癌或抑癌作用。多种 miRNA 表达的下调或上调在胃癌的发生、发展中发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。过表达 miR-34 后可诱导胃癌细胞凋亡、细胞周期阻滞或衰老<sup>[7]</sup>。miR-331 通过靶向 musashi1 可抑制胃癌的增殖、侵袭<sup>[8]</sup>。这些研究表明,miRNA 表达失调与胃癌的发生密切相关,因此,深入探讨与胃癌发生有关的 miRNA 及可能的作用机制,对进一步揭示胃癌的发生机制具有重要意义。

miR-218 主要由 miR-218-1 与 miR-218-2 编码,分别定位于染色体 4q 与 5q 位置,其异常表达与肿瘤的发生密切相关<sup>[9]</sup>。汤贝贝等<sup>[10]</sup>研究发现,miR-218 在宫颈癌患者中呈低表达,低表达者宫颈癌转移发生率较高,患者预后较差。TIAN 等<sup>[11]</sup>研究发现,过表达 miR-218 能够显著抑制食管癌细胞增殖、迁移、集落形成,促进细胞凋亡。上调 miR-218 表达能够明显抑制前列腺癌细胞增殖,促进癌细胞凋亡<sup>[12]</sup>。ZARE 等<sup>[13]</sup>研究发现,胃癌组织中 miR-218 呈低表达<sup>[13]</sup>。本研究为深入探讨 miR-218 在胃癌发生中的作用及对胃癌细胞生物行为学的影响,将 miR-218 mimics 序列转染至 SGC-7901 细胞;结果发现,转染 miR-218mimics 后细胞中 miR-218 表达明显升高,提示转染成功。CCK-8 检测发现,miR-218mimics 组细胞增殖抑制率明显高于阴性对照组和空白对照组,表明 miR-218 能够抑制胃癌细胞 SGC-7901 的增殖;另外,miR-218mimics 组细胞侵袭能力降低,提示 miR-218 能够抑制胃癌细胞 SGC-7901 的侵袭能力,推测 miR-218 可能通过抑制胃癌细胞增殖、侵袭而发挥抑癌作用。

miRNA 一般通过作用靶基因而影响肿瘤的进展,目前已研究的 miR-218 的靶基因较多,本研究通过 Targetsan 软件预测发现 NEDD9 可能为 miR-218 下游靶点。NEDD9 属于骨架蛋白,定位于染色体 6q 位置,在信号通路传递中主要发挥路由器作用,能够促进肿瘤转移,且在癌细胞增殖、凋亡、侵袭中也发挥重要作用<sup>[14]</sup>。有研究发现,NEDD9 异常表达与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[15]</sup>。GRAUZAM 等<sup>[16]</sup>研究发现,NEDD9 可通过上调基质金属蛋白酶-9 而加速口腔鳞状细胞癌细胞的侵袭性。KARABULUT 等<sup>[17]</sup>研究发现,胃癌患者 NEDD9 低表达者生存期明显高于高表达者。miRNA 与

NEDD9 表达密切有关,CHANG 等<sup>[18]</sup>研究发现,miR-363-3p 通过靶向 NEDD9 而抑制非小细胞肺癌细胞的迁移、侵袭和上皮间质转化。WANG 等<sup>[19]</sup>研究发现,miR-5195-3p 通过直接靶向 NEDD9 而抑制骨肉瘤细胞增殖和诱导凋亡。本研究发现,miR-218 mimics 组细胞中 NEDD9 蛋白表达明显低于阴性对照组和空白对照组,表明 miR-218 过表达可抑制 NEDD9 蛋白表达。本研究通过 Targetscan 预测发现,NEDD9 3'UTR 存在 miR-218 结合位点,双荧光酶活性实验结果显示,miR-218 mimics + NEDD9 3'UTR-Wt 组荧光素酶活性显著低于阴性对照组 + NEDD9 3'UTR-Wt 组,进一步证实 NEDD9 为 miR-218 靶基因,推测 miR-218 可能通过靶向 NEDD9 而影响胃癌细胞的增殖和迁移。

肿瘤侵袭、迁移过程中伴随着上皮-间质转化,丧失上皮细胞特征,表现为间质细胞特征,如 E-cadherin 上皮细胞标志物表达缺失或降低,vimentin、N-cadherin 间质细胞标志物表达升高。研究显示,当 E-cadherin 表达降低,vimentin、N-cadherin 表达升高后细胞骨架发生变化,细胞生物学特征改变,细胞黏附能力降低,易从原发病灶脱离,进而侵袭周边组织<sup>[20]</sup>。研究发现,过表达 E-cadherin 可抑制胃癌细胞上皮间质转化调控过程,进而降低胃癌细胞的侵袭能力<sup>[21]</sup>。E-cadherin 蛋白低表达,N-cadherin、vimentin 高表达与乳腺癌细胞的侵袭、迁移有关<sup>[22]</sup>。本研究发现,miR-218 mimics 组细胞中 E-cadherin 表达显著高于阴性对照组和空白对照组,vimentin、N-cadherin 蛋白表达显著低于阴性对照组和空白对照组,推测 miR-218 可靶向下调 NEDD9 表达,抑制胃癌细胞上皮间质转化,降低癌细胞侵袭,进而发挥抗肿瘤作用。

综上所述,miR-218 过表达的 SGC-7901 细胞中 NEDD9 蛋白表达显著下调,miR-218 可能通过靶向下调 NEDD9 表达而抑制胃癌细胞的增殖及侵袭能力。但本研究仅在体外验证了 miR-218 对 SGC-7901 细胞的抑制作用,在体内的作用尚不明确,仍需深入研究。

### 参考文献:

[1] 左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等.中国胃癌流行病学现状[J].中国肿瘤临床,2017,44(1):52-58.

[2] QADIR M I,FAHEEM A. MiRNA: a diagnostic and therapeutic tool for pancreatic cancer[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*,2017,27(3):197-204.

[3] TUTAR Y. MiRNA and cancer; computational and experimental approaches[J]. *Curr Pharm Biotechnol*,2014,15(5):429-436.

[4] ZHANG Z,KONG Y,YANG W, *et al.* MicroRNA-218 enhances gastric cancer cell cisplatin sensitivity by targeting survivin[J].

*Exp Ther Med*,2018,16(6):4796-4802.

[5] WANG G, FU Y, LIU G, *et al.* MiR-218 inhibits proliferation, migration, and EMT of gastric cancer cells by targeting WASF3 [J]. *Oncol Res*,2017,25(3):355-364.

[6] ZHANG X, DONG J, HE Y, *et al.* MiR-218 inhibited tumor angiogenesis by targeting ROBO1 in gastric cancer[J]. *Gene*,2017,615(7):42-49.

[7] JAFARI N, ABEDIANKENARI S. MicroRNA-34 dysregulation in gastric cancer and gastric cancer stem cell[J]. *Tumour Biol*,2017,39(5):1652-1657.

[8] YANG L Y, SONG G L, ZHAI X Q, *et al.* MicroRNA-331 inhibits development of gastric cancer through targeting musashi1 [J]. *World J Gastrointest Oncol*,2019,11(9):705-716.

[9] LIU Z, LU C, ZHAO G, *et al.* Downregulation of miR-218 by nicotine promotes cell proliferation through targeting CDK6 in non-small cell lung cancer [J]. *J Cell Biochem*,2019,120(10):18370-18377.

[10] 汤贝贝,刘水逸,魏礼清,等. miR-218 表达水平与宫颈癌侵袭转移及预后的关系[J]. *广东医学*,2015,36(14):2195-2197.

[11] TIAN H, HOU L, XIONG Y M, *et al.* MiR-218 suppresses tumor growth and enhances the chemosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma to cisplatin [J]. *Oncol Rep*,2015,33(2):981-989.

[12] HAN G, FAN M, ZHANG X. MicroRNA-218 inhibits prostate cancer cell growth and promotes apoptosis by repressing TPD52 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2015,456(3):804-809.

[13] ZARE A, AHADI A, LARKI P, *et al.* The clinical significance of miR-335, miR-124, miR-218 and miR-484 downregulation in gastric cancer[J]. *Mol Biol Rep*,2018,45(6):1587-1595.

[14] JURČIČ P, RADULOVIĆ P, BALJA M P, *et al.* E-cadherin and NEDD9 expression in primary colorectal cancer, metastatic lymph nodes and liver metastases [J]. *Oncol Lett*,2019,17(3):2881-2889.

[15] AFSAR C U, KARABULUT M, KARABULUT S, *et al.* Clinical significance of serum NEDD9 levels in patients with pancreatic cancer[J]. *Biomolecules*,2018,8(4):169.

[16] GRAUZAM S, BROCK A M, HOLMES C O, *et al.* NEDD9 stimulated MMP9 secretion is required for invadopodia formation in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*,2018,9(39):25503-25516.

[17] KARABULUT M, ALIS H, AFSAR C U, *et al.* Serum neural precursor cell-expressed, developmentally down regulated 9 (NEDD9) level may have a prognostic role in patients with gastric cancer[J]. *Biomed Pharmacother*,2015,73(7):140-146.

[18] CHANG J, GAO F, CHU H, *et al.* MiR-363-3p inhibits migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition by targeting NEDD9 and SOX4 in non-small-cell lung cancer[J]. *J Cell Physiol*,2020,235(2):1808-1820.

[19] WANG L, SHI G, ZHU D, *et al.* MiR-5195-3p suppresses cell proliferation and induces apoptosis by directly targeting NEDD9 in osteosarcoma [J]. *Cancer Biother Radiopharm*,2019,34(6):405-412.

[20] XU X, GU J, DING X, *et al.* LINC00978 promotes the progression of hepatocellular carcinoma by regulating EZH2-mediated silencing of p21 and E-cadherin expression [J]. *Cell Death Dis*,2019,10(10):752-759.

[21] 薛松,陈映霞. E-cadherin 在胃癌浸润与转移中作用的研究进展[J]. *临床肿瘤学杂志*,2015,20(6):555-558.

[22] ZHAO Z, FAN X, JIANG L, *et al.* MiR-503-3p promotes epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by directly targeting SMAD2 and E-cadherin [J]. *J Genet Genomics*,2017,44(2):75-84.

( 本文编辑:孟 月 )

( 上接第 218 页 )

[5] SALAZAR-MONTES A, RUIZ-CORRS L, LOPEZ-REYES A, *et al.* Potent antioxidant role of pirfenidone in experimental cirrhosis [J]. *Eur J Pharmacol*,2008,595(1/2/3):69-77.

[6] RAMACHANDRARAO S P, ZHU Y, RAVASI T, *et al.* Pirfenidone is renoprotective in diabetic kidney disease[J]. *J Am Soc Nephrol*,2009,20(8):1765-1775.

[7] SHARMA K, IX J H, MATHEW A V, *et al.* Pirfenidone for diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*,2011,22(6):1144-1151.

[8] 陈钰清,闫永吉,仇美华,等. 吡非尼酮抗纤维化作用的研究进展[J]. *临床药物治疗杂志*,2016,14(5):1-7.

[9] SHI Q, LIU X, BAI Y, *et al.* *In vitro* effects of pirfenidone on cardiac fibroblasts: proliferation, myofibroblast differentiation, migration and cytokine secretion [J]. *PLoS One*,2011,6(11):e28134.

[10] 马巧亚,李睿萍,铁晓玲,等. 祛风通络方对 uuo 大鼠肾间质纤维化相关蛋白  $\alpha$ -SMA 及 vimentin 表达的影响 [J]. *中医学报*,2019,34(8):1665-1669.

[11] AL-RASHEED N M, AL-RASHEED N M, BASSIOUMI Y A, *et al.* Simvastatin ameliorates diabetic nephropathy by attenuating oxidative stress and apoptosis in a rat model of streptozotocin-induced type 1 diabetes [J]. *Biomed Pharmacother*,2018,105(9):290-298.

[12] 阎婷婷,赵英政,易宪文,等. 氧化应激及炎症对糖尿病肾病的影响 [J]. *新乡医学院学报*,2019,36(8):701-705.

[13] LINDBLOM R, HIGGINS G, COUGHLAN M, *et al.* Targeting mitochondria and reactive oxygen species-driven pathogenesis in diabetic nephropathy [J]. *Rev Diabet Stud*,2015,12(1/2):134-156.

[14] 胡红利,肖中举. 丹参酮 II A 对人角膜基质细胞纤维化的抑制作用 [J]. *眼科新进展*,2018,38(12):1114-1118.

[15] AL-RASHEED N M, AL-RASHEED N M, AL-AMIN M A, *et al.* Fenofibrate attenuates diabetic nephropathy in experimental diabetic rat's model via suppression of augmented TGF- $\beta$ <sub>1</sub>/Smad3 signaling pathway [J]. *Arch Physiol Biochem*,2016,122(4):186-194.

[16] JIE L, PENGCHENG Q, QIAOYAN H, *et al.* Dencichine ameliorates kidney Injury in induced type II diabetic nephropathy via the TGF- $\beta$ /Smad signalling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*,2017,812(10):196-205.

( 本文编辑:杨 博 )