

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.06.002

## miR-125a-5p 通过下调 BAG4 表达抑制胃癌细胞迁移和侵袭

姜雷<sup>a</sup>, 陈燕<sup>b</sup>, 王军<sup>a</sup>, 闵光涛<sup>a</sup>, 陈伟<sup>a</sup>, 王红鹏<sup>a</sup>, 王向文<sup>a</sup>, 姚南<sup>a</sup> (兰州大学第一医院 a. 普外六科; b. 口腔科, 甘肃兰州 730030)

**[摘要]** **目的:** 探讨 miR-125a-5p 通过调控 Bcl-2 相关永生基因 4 (Bcl-2-associated athanogene 4, BAG4) 的表达抑制胃癌细胞迁移和侵袭的分子机制。**方法:** 选用 2014 年 1 月至 2015 年 12 月兰州大学第一医院手术切除的 82 例胃癌组织标本及配对的癌旁组织以及人胃癌细胞系 MGC803、BGC823、SGC7901、HGC27 及人胃黏膜上皮细胞 (GES-1), qPCR 法检测胃癌组织、癌旁组织及胃癌细胞系中 miR-125a-5p 的表达水平。分别将 miR-125a-5p mimic、miR-125a-5p inhibitor、(si-BAG4) siRNA-BAG4 及阴性对照质粒转染至胃癌细胞, 划痕愈合实验和 Transwell 侵袭实验分别检测 miR-125a-5p/BAG4 信号轴对胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响。WB 检测胃癌细胞中 BAG4 蛋白的表达。荧光素酶报告基因实验验证 miR-125a-5p 和 BAG4 之间的靶向调控关系。**结果:** miR-125a-5p 在胃癌组织和细胞系中均低表达 (均  $P < 0.01$ )。miR-125a-5p 的表达与患者的性别 ( $P = 0.953$ )、年龄 ( $P = 0.772$ )、肿瘤部位 ( $P = 0.867$ )、组织学分级 ( $P = 0.745$ ) 和肿瘤大小 ( $P = 0.088$ ) 无相关性, 与胃癌患者的 T 分期 ( $P = 0.003$ )、N 分期 ( $P = 0.001$ )、M 分期 ( $P = 0.027$ ) 和 TNM 分期 ( $P = 0.035$ ) 显著相关, 差异有统计学意义。miR-125a-5p 低表达是胃癌患者总生存时间的独立危险因素。过表达 miR-125a-5p 显著抑制胃癌细胞的迁移和侵袭能力 (均  $P < 0.01$ )。敲降 BAG4 可逆转 miR-125a-5p inhibitor 对胃癌细胞迁移和侵袭能力的抑制作用。荧光素酶报告基因实验证实 miR-125a-5p 可与 BAG4 3' 非翻译区 (untranslated regions, UTR) 结合抑制其表达。**结论:** miR-125a-5p 通过靶向下调 BAG4 的表达水平进而抑制胃癌细胞的迁移和侵袭。

**[关键词]** miR-125a-5p; Bcl-2 相关永生基因 4; 胃癌; 迁移; 侵袭

**[中图分类号]** R730.54; R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)06-0558-09

## miR-125a-5p regulates migration and invasion of gastric cancer cells by down-regulating BAG4 expression

JIANG Lei<sup>a</sup>, CHEN Yan<sup>b</sup>, WANG Jun<sup>a</sup>, MIN Guangtao<sup>a</sup>, CHEN Wei<sup>a</sup>, WANG Hongpeng<sup>a</sup>, WANG Xiangwen<sup>a</sup>, YAO Nan<sup>a</sup> (a. Sixth Department of General Surgery; b. Department of Stomatology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the molecular mechanism of miR-125a-5p suppressing the migration and invasion of gastric cancer cells by regulating expression of Bcl-2-associated athanogene 4 (BAG4) gene. **Method:** A total of 82 pairs of gastric cancer tissues and corresponding para-cancer tissues were obtained from gastric cancer patients who received curative surgery at the First Hospital of Lanzhou University during January 2014 to December 2015. Human gastric cancer cell lines (MGC803, BGC823, SGC7901, HGC27) and human gastric epithelium cell line (GES-1) were also collected for this study. Real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) method was used to detect the expression level of miR-125a-5p in gastric cancer tissues, para-cancer tissues and gastric cancer cell lines. miR-125a-5p mimics, miR-125a-5p inhibitor, si-BAG4 (siRNA-BAG4) and negative control plasmids were transiently transfected into gastric cancer cells, respectively. The effect of miR-125a-5p/BAG4 signaling axis on migratory and invasive ability of gastric cancer cells was determined by Wound healing assay and Transwell invasion assay, respectively. WB was used to detect BAG4 protein expression in gastric cancer cells. The targeted regulatory relationship between miR-125a-5p and BAG4 was determined by Luciferase reporter gene assay. **Result:** miR-125a-5p was down-regulated in gastric cancer tissues and gastric cancer cell lines. The expression level of miR-125a-5p was not correlated with gender ( $P = 0.953$ ), age ( $P = 0.772$ ), tumor location ( $P = 0.867$ ), histological grade ( $P = 0.745$ ) and tumor size ( $P = 0.088$ ) of gastric cancer patients, but significantly correlated with T stage ( $P = 0.003$ ), N stage

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (No. 82060527); 兰州大学第一医院院内基金项目 (ldyyyn2019-02), 2020 年度兰州市科技发展指导性计划项目 (No. 2020-ZD-66)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82060527), Intra-hospital Fund Project of the First Hospital of Lanzhou University (ldyyyn2019-02), and Science and Technology Development Guiding Plan Project of Lanzhou, China (No. 2020-ZD-66)

**[作者简介]** 姜雷 (1981—), 男, 博士, 副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤临床与基础研究, E-mail: jiangzx@lzu.edu.cn

**[通信作者]** 姚南 (YAO Nan, corresponding author), 教授, 主要从事胃肠道肿瘤基础与临床研究, E-mail: 405446244@qq.com

( $P=0.001$ ), M stage ( $P=0.027$ ) and TNM stage ( $P=0.035$ ) in gastric cancer patients, and the differences were statistically significant. Low expression of miR-125a-5p was an independent risk factor for overall survival of gastric cancer patients. miR-125a-5p significantly inhibited the migration and invasion of gastric cancer cells (all  $P<0.01$ ). Knockdown BAG4 could reverse the inhibitory effect of miR-125a-5p inhibitor on migration and invasion of gastric cancer cells. Luciferase reporter gene assay validated that miR-125a-5p could bind with BAG4 3'UTR (Untranslated Regions) to suppress its expression. **Conclusion:** miR-125a-5p inhibits the migration and invasion of gastric cancer cells by down-regulating the expression level of BAG4.

**[Key words]** miR-125a-5p; Bcl-2-associated athanogene 4; gastric cancer; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(6): 558-566. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.06.002]

在世界范围内,胃癌的死亡率在恶性肿瘤中居第三位<sup>[1]</sup>。而中国每年新增胃癌病例数约占全球新增病例总数的46.8%,胃癌相关死亡病例约占全球总数的47.8%<sup>[2]</sup>。侵袭、转移是恶性肿瘤典型的生物学行为,约90%的胃癌患者最终都死于复发与转移<sup>[3]</sup>。因此,寻找预测胃癌侵袭转移分子标志物是亟待解决的科学问题。MicroRNA(miRNA)是一类长度约为22个核苷酸的非编码RNA,其功能是通过与靶基因mRNA的3'-非翻译区(3'-UTR)互补结合,引起靶基因mRNA的降解或翻译抑制,以此调控靶基因的表达发挥作用<sup>[4-5]</sup>。miR-125a-5p在多种恶性肿瘤中低表达,且其低表达可与肿瘤发生发展及不良预后密切相关<sup>[6-10]</sup>。但是miR-125a-5p在胃癌侵袭转移中的作用及分子机制研究还比较少。有研究<sup>[11]</sup>显示miR-125a-5p抑制了胃癌细胞的侵袭,另一项研究<sup>[9]</sup>却发现miR-125a-5p并不能抑制胃癌细胞的侵袭转移。Bcl-2相关永生基因4(Bcl-2-associated athanogene 4, BAG4)也叫死亡结构域沉默子(silencer of death domains, SODD),是BAG家族的成员之一<sup>[12]</sup>。已有研究<sup>[13]</sup>证实BAG4在胃癌细胞中高表达,促进了胃癌细胞的侵袭。本课题通过生物信息学分析发现miR-125a-5p与BAG4存在潜在的结合位点,拟探讨miR-125a-5p通过调控BAG4的表达从而影响胃癌细胞侵袭的可能机制,为胃癌的靶向治疗提供新的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料

选取2014年1月至2015年12月在兰州大学第一医院接受手术的胃癌组织标本( $n=82$ )及配对的癌旁组织(距离肿瘤 $>3$  cm),胃癌标本手术切下后尽快保存于液氮罐中,并标识清楚患者的相关信息,其中,男性58例、女性24例,年龄 $54.85\pm 11.49$ 岁。病理分期采用第8版胃癌TNM分期标准。病例纳入标准如下:(1)经病理组织学检查证实为胃癌;(2)术前未接受化疗、放疗、分子靶向治疗及生物治疗;(3)有完整的临床病理资料,主要包括年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、肿瘤分化程度、浸润深度、淋巴结转移、远

处转移和TNM分期等临床病理学检查结果;(4)有完整的随访资料,随访时间3~67个月,中位随访时间36.5月;(5)入组患者均签署知情同意书,经所在医院伦理学委员会批准通过。

### 1.2 细胞系及主要试剂

人胃癌细胞系MGC803、BGC823、SGC7901、HGC27及人胃黏膜上皮细胞(GES-1)均购于中国科学院上海生科院细胞资源中心。胎牛血清购于北京四季青生物科技有限责任公司,RPMI 1640培养基购于美国HyClone公司,胰蛋白酶-EDTA消化液、青链霉素混合液购于北京索来宝科技有限责任公司。TRIzol试剂购于北京康为世纪生物科技有限公司,反转录试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit和SYBR Premix Ex Taq™ II试剂盒购自日本TaKaRa公司。U6、miR-125a-5p引物、miR-125a-5p模拟物(mimic)、miR-125a-5p抑制剂(inhibitor)及对照质粒(miR-Control)由广州锐博生物科技有限公司合成。Transwell小室购于美国millipore公司,Matrigel基质胶购于美国BD Biosciences公司。荧光素报告基因试剂盒购自美国Promega公司,Lipofectamine™ 3000转染试剂盒购于美国Invitrogen公司。SDS-PAGE凝胶制备试剂盒和SDS-PAGE蛋白上样缓冲液购于上海碧云天生物科技有限公司,SDS-PAGE电泳液和脱脂奶粉封闭液购于北京康为世纪生物科技有限公司,Pageruler prest protein ladder购于美国Thermo公司。BAG4抗体购于英国Abcam公司, $\beta$ -actin抗体购于美国CST公司,二抗购于武汉三鹰生物科技有限公司。

### 1.3 细胞培养及转染

人胃癌细胞系用含10%胎牛血清、1%青链霉素混悬液的RPMI 1640细胞培养基,置于细胞孵育箱( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 、湿度100%)中常规培养。当细胞汇合度达到80%~90%时,用胰酶-EDTA消化后,按细胞密度为 $1\times 10^5$ 个/ml孔接种于6孔板中进行后续实验。当细胞汇合度达到30%~50%时,可参照Lipofectamine™ 3000转染试剂盒说明书进行细胞转染。实验分为以下四组:miR-125a-5p mimic组、miR-125a-5p inhibitor组、阴性对照组和miR-125a-5p inhibitor+si-BAG4(siRNA-BAG4)组,分别瞬时转染至MGC803和

SGC7901 细胞, 转染 6 h 后更换培养基, 24 h 后检测转染效率, 转染成功的细胞用于后续实验。

#### 1.4 qPCR 法检测胃癌组织和细胞系中 miR-125a-5p 的表达水平

按照 TRIzol 法提取胃癌组织、癌旁组织及胃癌细胞中的总 RNA, 利用超微量分光光度计检测 RNA 的浓度。按照逆转录试剂盒操作说明书将 RNA 逆转录为 cDNA, 反应条件为 37 °C 15 min、85 °C 5 s。采用 qPCR 试剂盒检测 miR-125a-5p 和 BAG4 的表达水平。q-PCR 的引物序列如表 1 所示。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 10 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 20 s, 95 °C 延伸 15 s, 共 40 个循环。以 U6 为内参计算 miR-125a-5p 的相对表达水平, 以  $\beta$ -actin 为内参计算 BAG4 的相对表达水平, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算检测结果。

#### 1.5 生物信息学方法分析筛选 miR-125a-5p 的潜在靶向基因

采用生物信息学方法, 通过 TargetScan (<http://www.targetscan.org>)、miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>)、StarBase (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 及 miRWalk (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/predictedmirnagene.php>) 等数据库预测 miR-125a-5p 结合的靶基因, 并采用韦恩图筛选其可能的靶基因。

#### 1.6 Western blotting(WB)检测胃癌细胞中 BAG4 蛋白的表达水平

取各组处于对数生长期的胃癌细胞, 加入 RIPA 裂解液(RIPA Lysis Buffer)和蛋白酶抑制剂混合物, 提取各组细胞的总蛋白。采用 BCA 法检测各样品的蛋白浓度, 待测样品中加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 分别进行蛋白样品上样、电泳、转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 BAG4 一抗(1:1 000), 4 °C 孵育过夜, PBST 清洗一抗后, 加入 HRP 标记的二抗(1:5 000), 孵育 1 h, 充分清洗后, 在 PVDF 膜上滴加 ECL 显影, 全自动凝胶成像仪分析其灰度值, 以  $\beta$ -actin 作为内参, 比较各组细胞中的蛋白相对表达量。

#### 1.7 划痕愈合实验检测胃癌细胞的迁移能力

收集各组胃癌细胞, 当细胞汇合度大约为 80% 时, 将各组胃癌细胞接种于 6 孔板中, 每组设置 3 个复孔, 待各组细胞充分贴壁后, 用 200  $\mu$ l 微量移液器枪头在培养皿底部划一条横线, 尽量冲洗干净划痕部位的细胞, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基继续培养。分别在 0 和 24 h 在显微镜下观察胃癌细胞的迁移情况并拍照, 使用 ImageJ 软件测量各组细胞的迁移距离, 进行统计分析。

#### 1.8 Transwell 侵袭实验检测胃癌细胞的侵袭能力

准备好各组胃癌细胞, 当细胞汇合度大约为 80%

时, 加入胰酶-EDTA 消化液, 用无血清培养基重悬细胞, 并将细胞密度调整  $5 \times 10^5$ /ml。将 Matrigel 基质胶小心涂抹在 Transwell 小室上层的膜表面, 小室上层内加入 200  $\mu$ l 不含胎牛血清的培养基, 在小室下层内加入 600  $\mu$ l 含 10% 胎牛血清的培养基, 放入细胞孵育箱中常规培养 24 h。4% 多聚甲醛溶液固定细胞 20 min, 结晶紫染液室温染色 15 min, PBS 充分冲洗后, 将 Transwell 小室倒置, 显微镜下随机选取 5 个视野拍照、计数, 统计穿过小室滤膜的细胞数。

#### 1.9 荧光素酶报告基因实验检测 miR-125a-5p 与 BAG4 间的靶向关系

TargetScan 数据库预测显示 miR-125a-5p 与 BAG4 的 3'-UTR 区具有结合位点, 采用荧光素酶报告基因实验进行验证, 分别构建 BAG4 野生型(WT)及突变型(MUT)报告基因质粒。取处于对数生长期的胃癌细胞, 调整细胞密度以  $2 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中, 利用 Lipofectamine™ 3000 在胃癌细胞中分别转染 WT-BAG4 或 MUT-BAG4 报告基因质粒, 同时转染 miR-125a-5p mimic 或 miR-125a-5p inhibitor。参照荧光素酶报告基因检测试剂盒的说明书, 检测各组荧光素酶的活性。

#### 1.10 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行统计分析, 所有实验均重复 3 次。采用  $\chi^2$  检验分析 miR-125a-5p 的表达水平与胃癌患者临床病理特征参数之间的相关性, Log-rank 法比较 miR-125a-5p 的表达水平与胃癌患者总生存时间之间的差异, Cox 比例风险回归模型进行单因素和多因素生存分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  来表示, 两组组间比较采用 *t* 检验, 多组组间比较采用 One-way ANOVA 检验, 采用 GraphPad Prism 6.0 软件绘图, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-125a-5p 在胃癌组织和细胞系中均低表达

采用 qPCR 的方法检测癌旁组织( $n=40$ )和胃癌组织( $n=82$ )中 miR-125a-5p 的表达状况, 结果显示, 胃癌组织中 miR-125a-5p 表达水平显著低于癌旁组织( $P < 0.01$ ; 图 1A); 胃癌细胞系 MGC803、SGC7901、BGC823 和 HGC27 细胞中 miR-125a-5p 表达水平显著低于胃黏膜上皮细胞 GES-1 (均  $P < 0.01$ ; 图 1B)。上述实验结果表明, miR-125a-5p 在胃癌组织和细胞系中均低表达。

### 2.2 miR-125a-5p 的表达与胃癌患者临床病理参数及预后之间的相关性

基于 82 例胃癌患的 miR-125a-5p 的表达数值计算其约登指数, 约登指数最大者为 cut off 值(临界

值), miR-125a-5p 低表达者 38 例, 高表达者 44 例。分析 miR-125a-5p 表达与胃癌患者临床病理特征参数及预后的相关性, 结果表明: miR-125a-5p 的表达与胃癌患者的性别 ( $P=0.953$ )、年龄 ( $P=0.772$ )、肿瘤部位 ( $P=0.867$ )、组织学分级 ( $P=0.745$ ) 和肿瘤大小 ( $P=0.088$ ) 无相关性, 与胃癌患者的 T 分期 ( $P=0.003$ )、N 分期 ( $P=0.001$ )、M 分期 ( $P=0.027$ ) 和 TNM 分期 ( $P=0.035$ ) 显著相关, 差异有统计学意义 (表 2)。

### 2.3 miR-125a-5p 的表达水平与胃癌患者的预后的相关性

Kaplan-Meier 法绘制患者的生存曲线, miR-125a-5p 低表达和高表达的胃癌患者中位生存时间分别为 25 和 46 个月, 生存分析结果显示, 两组患者在总生存 (overall survival, OS) 时间方面差异有统计学意义 [HR=0.443, 95%CI(0.205~0.749),  $P=0.006$ ; 图 1C], 表明 miR-125a-5p 的表达水平与胃癌患者的预后呈正相关。单因素回归分析结果表明, T 分期 (肿瘤浸润深度)、N 分期 (淋巴结转移)、M 分期 (远处转移)、TNM 分期、肿瘤大小和 miR-125a-5p 的表达状况与胃癌患者的 OS 相关; 多因素方差分析结果表明 T 分期、N 分期和 miR-125a-5p 低表达是胃癌患者预后的独立危险因素 (表 3 和图 1D)。

表 1 qPCR 的引物序列

Tab.1 Sequences of primers used for qPCR

Gene	Sequence
BAG4	F: 5'-AATGGAGCGTATGGTCCAACA-3'
	R: 5'-GGCCAAGAGTGTGCTAAAGAA-3'
U6	F: 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'
	R: 5'-TTCACGAATTTGCGTGTTCATC-3'
miR-125a-5p	F: 5'-TGAGACCCTTTAACCTGTGA-3'
	R: 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'
β-actin	F: 5'-GAATTCATGTTTGAGACCTTCAA-3'
	R: 5'-CGGATCCATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'

### 2.4 miR-125a-5p 抑制胃癌细胞的迁移和侵袭

鉴于 miR-125a-5p 在胃癌细胞系 MGC803 中表达最低, 而在 SGC7901 中表达量相对较高, 因此选择 MGC803 和 SGC7901 细胞进行后续实验 (图 1B)。转染 miR-125a-5p inhibitor 降低了胃癌细胞 SGC7901 中 miR-125a 的表达水平 ( $P<0.01$ ; 图 2A); 而转染 miR-125a-5p mimic 可显著升高 MGC803 细胞中 miR-125a 的表达水平 ( $P<0.01$ ; 图 2B)。

通过转染 miR-125a-5p mimic 或 inhibitor 过表达或抑制胃癌细胞中的 miR-125a, 采用划痕愈合实验和 Transwell 侵袭实验对其迁移和侵袭能力进行评价。细胞划痕实验结果显示, 过表达 miR-125a-5p

后, 胃癌细胞 MGC803 的迁移率明显降低 ( $P<0.01$ ; 图 3A), 而抑制 miR-125a-5p 后, 胃癌细胞 SGC7901 的迁移率明显增加 ( $P<0.01$ ; 图 3B)。Transwell 侵袭实验结果显示, 过表达 miR-125a-5p 后, MGC803 胃癌细胞的侵袭数量显著减少 ( $P<0.001$ ; 图 3C), 而抑制 miR-125a-5p 后, 胃癌细胞 SGC7901 的侵袭数量明显增加 ( $P<0.01$ ; 图 3D)。

上述实验结果表明, miR-125a-5p 抑制胃癌细胞的迁移和侵袭能力。

表 2 miR-125a-5p 表达与胃癌患者临床病理特征的相关性  
Tab.2 The correlation between miR-125a-5p expression and clinicopathological features in patients with gastric cancer

Prognostic variables	N	miR-125a-5p expression		$\chi^2$	P
		Low	High		
Gender					
Male	58	27	31	0.004	0.953
Female	24	11	13		
Age (t/a)					
<60	51	23	28	0.084	0.772
≥60	31	15	16		
Tumor location					
Proximal+middle	31	14	17	0.028	0.867
Distal	51	24	27		
Histological grade					
G1+G2	23	10	13	0.105	0.745
G3	59	28	31		
Tumor size (d/cm)					
<5 cm	65	27	38	2.909	0.088
≥5 cm	17	11	6		
T stage					
T1-T2	29	7	22	8.896	0.003
T3-T4	53	31	22		
N stage					
N0	34	8	26	12.155	0.001
N1-N3	48	30	18		
M stage					
M0	78	34	44	4.869	0.027
M1	4	4	0		
TNM stage					
I+II	53	20	33	4.463	0.035
III+IV	29	18	11		

### 2.5 miR-125a-5p 通过靶向 BAG4 调控胃癌细胞的侵袭转移

采用生物信息学方法通过数据库预测 miR-125a-5p 的靶基因, 采用韦恩图筛选其可能的靶基因, 发现有

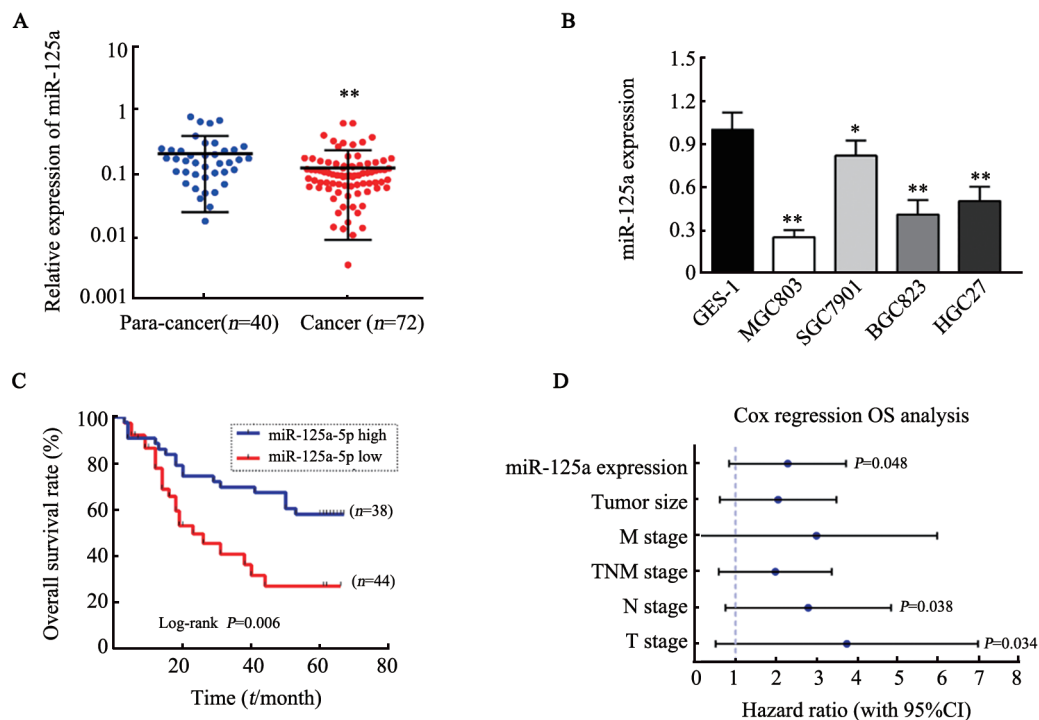
4个共有的靶基因,分别是 BAG4、DRAM2、GCNT1 和 STARD13,查阅文献后得知 BAG4 在胃癌侵袭转

移中的作用已明确,推测 BAG4 可能是 miR-125a-5p 的靶基因(图4)。

表3 胃癌患者总生存时间的单因素和多因素 Cox 比例风险回归模型分析

Tab.3 Univariate and multivariate analyses of factors affecting OS in patients with gastric cancer

Prognostic variables	Univariate OS analysis			Multivariate OS analysis		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Gender	1.090	0.575-2.068	0.792	--	--	--
Age (t/a)	1.252	0.665-2.359	0.486	--	--	--
Histological grade	0.663	0.334-1.201	0.161	--	--	--
Tumor location	0.762	0.404-1.436	0.400	--	--	--
T stage	4.907	2.047-11.762	0.000	2.816	1.080-7.341	0.034
N stage	3.919	1.897-8.093	0.002	2.295	1.046-5.037	0.038
M stage	5.358	1.836-15.631	0.003	1.935	0.589-6.358	0.277
TNM stage	2.553	1.363-4.780	0.000	1.654	0.779-3.511	0.190
Tumor size	3.265	1.684-6.330	0.007	1.716	0.814-3.621	0.156
miR-125a expression	2.409	1.271-4.567	0.000	1.983	1.020-3.857	0.048



\*\*P<0.01 vs Para-cancer tissue group or GES-1 cells

A: The expression of miR-125a-5p in gastric cancer tissues was detected by qPCR; B: The expression of miR-125a-5p in gastric cancer cell lines was measured by qPCR; C: Kaplan-Meier analysis of eighty two gastric cancer patients; D: Prognostic significance of miR-125a-5p was calculated using univariate Cox regression analysis

图1 miR-125a-5p在胃癌组织和胃癌细胞系中低表达,其表达水平与总生存时间呈正相关

Fig.1 miR-125a-5p was down-regulated in gastric cancer tissues and cancer cell lines, and its expression level was positively correlated with OS

WB结果显示,转染 miR-125a-5p mimic 后,BAG4 蛋白表达水平下降(图5A),而转染 miR-125a-5p inhibitor 后,BAG4 蛋白表达水平上调(图5B)。细胞划痕实验结果显示,SGC7901 细胞中转染 si-BAG4 后,与对照组

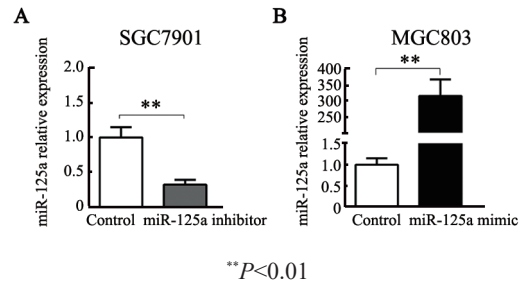
相比,其迁移率明显降低(P<0.01;图5C),而同时转染 si-BAG4 和 miR-125a-5p inhibitor 后,胃癌细胞 SGC7901 的迁移率与对照组无显著差异(P>0.05;图5C)。Transwell 侵袭细胞实验结果显示,SGC7901 细胞

中转染 si-BAG4 后, 与对照组相比, 其侵袭细胞数量明显降低 ( $P < 0.01$ ; 图 5D), 而同时转染 si-BAG4 和 miR-125a-5p inhibitor 后, 胃癌细胞 SGC7901 的侵袭数量与对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ; 图 5D)。上述实验结果表明, miR-125a-5p 负性调控 BAG4 的表达, 抑制了胃癌细胞的迁移和侵袭。

### 2.6 荧光素酶报告基因实验验证 miR-125a-5p 靶向调控 BAG4

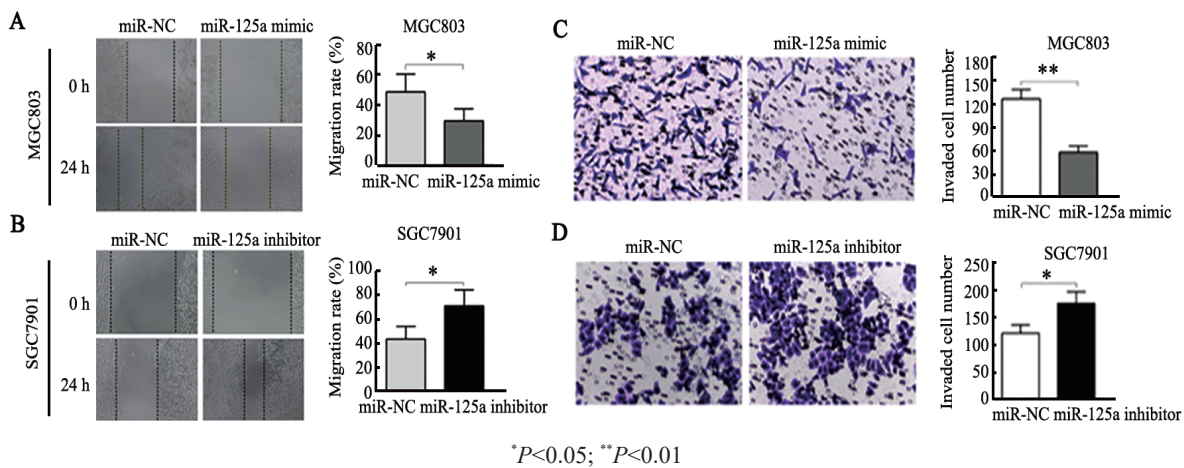
TargetScan 数据库生物信息学分析发现 miR-125a-5p 和 BAG4 的 3'-UTR 存在互补结合位点 (图 6A、B)。因此, 采用荧光素酶报告基因实验进一步验证, 实验结果显示, 与对照组相比, WT-BAG4 3'-UTR 的胃癌细胞中, miR-125a-5p mimic 显著抑制 MGC803 细胞 WT-BAG4 质粒荧光活性 ( $P < 0.001$ ), 但对 MUT-BAG4 质粒荧光活性无影响 ( $P > 0.05$ ) (图 6C); 而 miR-125a-5p inhibitor 显著增加 SGC7901 细胞 WT-BAG4 质粒荧光活性 ( $P < 0.001$ ), 对 MUT-

BAG4 突变型质粒荧光活性无影响 ( $P > 0.05$ ) (图 6D)。上述结果验证 miR-125a-5p 通过靶向结合 BAG4 的 3'UTR, 下调其表达水平。



A: The transfection efficiency of miR-125a inhibitor was detected by qPCR; B: The transfection efficiency of miR-125a mimics was detected by qPCR

图 2 胃癌细胞中 miR-125a-5p inhibitor/mimic 的转染效率  
Fig.2 Transfection efficiency of miR-125a-5p inhibitor/mimic in gastric cancer cells



A, B: Migration of MGC803 (A) and SGC7901 (B) cells were measured by Wound healing assays ( $\times 200$ ); C, D: Invasion of MGC803 (C) and SGC7901 (D) cells were detected by Transwell assays ( $\times 200$ )

图 3 miR-125a-5p 抑制胃癌细胞的迁移和侵袭

Fig.3 miR-125a-5p inhibited the migration and invasion of gastric cancer cells

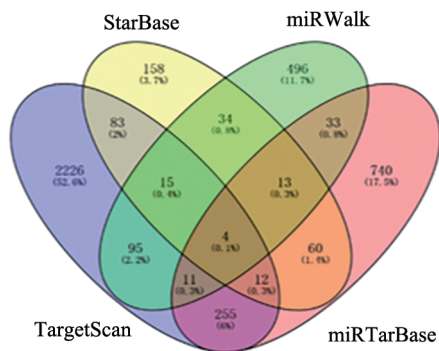


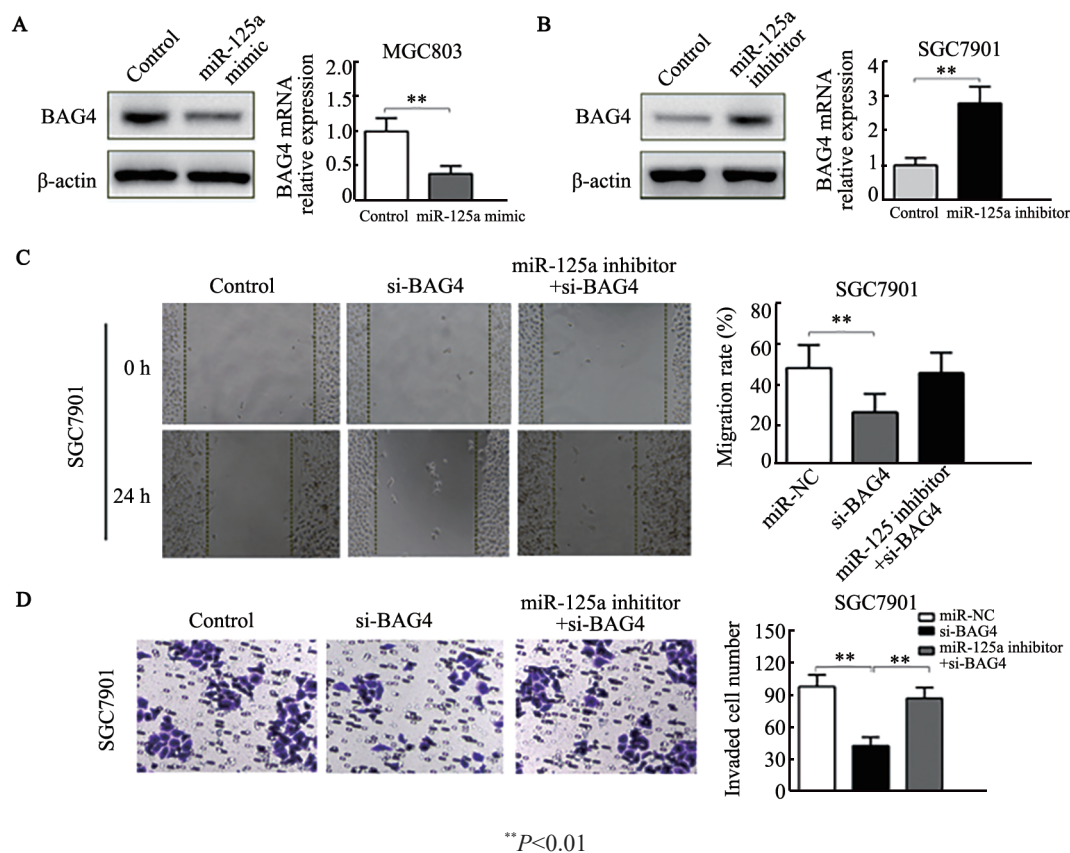
图 4 生信分析预测 miR-125a-5p 的靶基因

Fig.4 Bioinformatics predicted the target genes of miR-125a-5p

### 3 讨论

miRNA 主要的功能是对靶基因转录后的表达水平进行精细调控<sup>[14-15]</sup>。miRNA 在调控肿瘤细胞的生物学功能中发挥着重要作用, 如肿瘤细胞的分化、自噬、耐药、血管生成、增殖、侵袭、迁移和凋亡<sup>[4,5,16]</sup>。多种 miRNA 在肿瘤细胞中异常表达, 通过调控靶基因发挥着抑癌基因或癌基因的作用<sup>[4,15-16]</sup>。

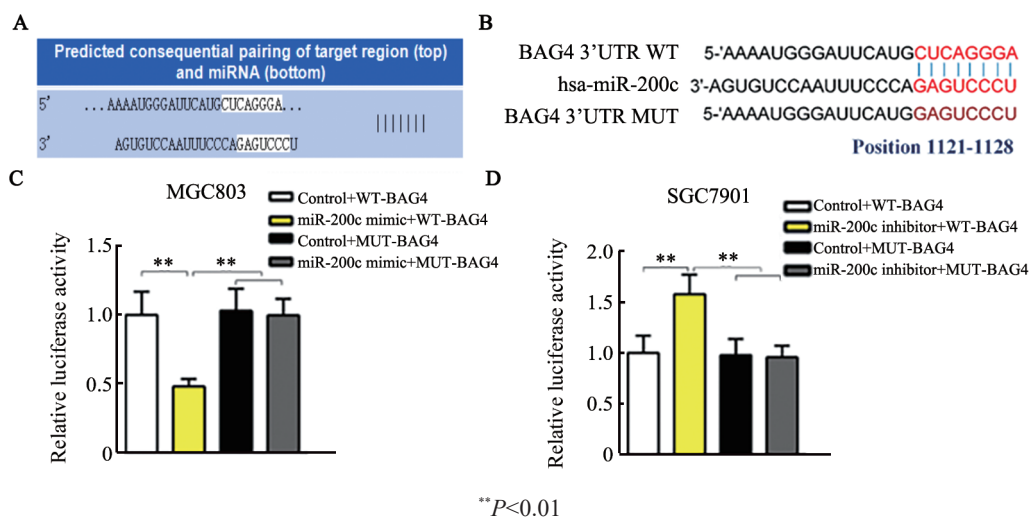
miR-125a-5p 位于 19 号染色体的 q13.41, 已有研究 miR-125a-5p 在多种恶性肿瘤中均低表达, 如胃癌<sup>[6,11,17]</sup>、肺癌<sup>[8]</sup>、乳腺癌<sup>[7]</sup>及神经胶质瘤<sup>[18]</sup>等, 且其表



A: The relative expression of BAG4 mRNA and protein were detected by qPCR and WB in MGC803 gastric cancer cells after transfection with miR-9 mimics; B: The relative expression of BAG4 mRNA and protein were detected by qPCR and WB in SGC7901 gastric cancer cells after transfection with miR-9 inhibitor; C: Effects of miR-125a and BAG4 on the migration of SGC7901 ( $\times 200$ ); D: Effects of miR-125a and BAG4 on the invasion of SGC7901 ( $\times 200$ )

图5 miR-125a-5p通过负向调控BAG4表达抑制胃癌细胞的迁移和侵袭

Fig.5 miR-125a-5p inhibited the migration and invasion of gastric cancer cells by negatively regulating BAG4 expression



A: The binding sites between miR-125a and BAG4 was predicted by TargetScan database; B: Schematic representation of BAG4-3'UTR showed the putative miR-125a binding sites; (C, D): Dual luciferase reporter assay verified that BAG4 was the target gene of miR-125a

图6 荧光素酶报告基因实验验证miR-125a-5p靶向调控BAG4

Fig.6 Luciferase reporter gene assay confirmed that miR-125a-5p regulates BAG4

达状况与患者的临床病理参数及预后密切相关<sup>[10]</sup>。Meta分析结果显示,miR-125a-5p表达水平与恶性肿瘤患者的总生存时间[HR=0.459, 95%CI (0.369~

0.57),  $P < 0.001$ ]和无病生存时间[HR=0.343, 95%CI (0.237~0.496),  $P < 0.001$ ]呈正相关,尤其与肺癌([HR=0.343, 95%CI(0.224~0.517),  $P < 0.001$ ])和胃癌

[HR=0.341, 95%CI (0.160~0.725),  $P<0.005$ )] 患者的预后密切相关<sup>[10]</sup>。NISHIDA 等<sup>[17]</sup>首次发现 miR-125a-5p 在胃癌组织中低表达, 其低表达与肿瘤大小 ( $P=0.0068$ )、肿瘤侵袭深度 ( $P=0.031$ )、肝转移 ( $P=0.029$ )、不良预后 ( $P=0.0069$ ) 等恶性潜能增强密切相关, 多因素分析显示, miR-125a-5p 低表达是胃癌患者不良预后的独立危险因素。LI 等<sup>[9]</sup>的研究也表明 miR-125a-5p 在胃癌组织中低表达, 其表达水平与肿瘤大小、Ki67 表达水平及 TNM 分期密切相关, 生存分析结果显示, miR-125a-5 的表达水平与胃癌患者的总生存时间呈正相关 [HR=0.528, 95%CI (0.338~0.825),  $P<0.005$ ]。后续研究也显示, miR-125a-5p 在胃癌组织中低表达<sup>[6, 11]</sup>。本研究也显示, miR-125a-5p 在胃癌组织和胃癌细胞系中低表达, 且其表达水平与浸润深度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期及不良预后呈负相关。

现有研究<sup>[15]</sup>表明某一 miRNA 可以同时调控多个靶基因, 而一个靶基因也可能同时受到多个 miRNA 的靶向调控。NISHIDA 等<sup>[17]</sup>的研究表明 miR-125a-5p 可通过负性调控 HER2 的表达抑制胃癌细胞的增殖。XU 等<sup>[6]</sup>的研究也显示过表达 miR-125a-5p 显著抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 荧光素酶报告基因实验证实 E2F3 是 miR-125a-5p 潜在的靶基因。LI 等<sup>[9]</sup>的研究显示 miR-125a-5p 在胃癌细胞中低表达, 但是体外实验结果却表明调控 miR-125a-5p 的表达水平并不能抑制胃癌细胞的侵袭转移。CAO 等<sup>[11]</sup>的研究也发现 miR-125a-5p 在胃癌组织中低表达, 可抑制胃癌细胞的侵袭转移, BRMS1 是 miR-125a-5p 潜在的靶基因。本研究与多数研究结果一致, 证实了 miR-125a-5p 抑制胃癌细胞的迁移和侵袭。通过 TargetScan 等多个生物信息学网站预测发现 BAG4 是 miR-125a-5p 潜在的靶基因, 通过 WB 和 qPCR 实验证实 miR-125a-5p 可负向调控 BAG4 的表达, 荧光素酶报告基因实验也证实 miR-125a-5p 可负向调控 BAG4 的表达。

本研究发现 miR-125a-5p 可通过负调控 BAG4 的表达抑制胃癌细胞的侵袭转移。BAG4 是 BAG 家族的成员之一, 具有多种生物学功能, 如细胞凋亡、细胞骨架重塑、自噬、增殖、迁移和侵袭等<sup>[12-13, 19]</sup>。近年来, 越来越多的研究发现 BAG4 在多种恶性肿瘤中均高表达, 如胰腺癌<sup>[20]</sup>、卵巢癌<sup>[21]</sup>、乳腺癌<sup>[22]</sup>、急性淋巴细胞白血病<sup>[23]</sup>、结肠癌<sup>[24]</sup>和胃癌<sup>[13]</sup>等, BAG4 高表达与肿瘤的恶性生物学行为密切相关。BAG4 在胃癌组织和胃癌细胞系中高表达, 同时促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[13]</sup>。DAVIDSON 等<sup>[22]</sup>的研究也表明, BAG4 在乳腺癌组织中高表达, 其表达水平与乳腺癌患者的不良预后密切相关, 是乳腺癌患者不良

预后的独立危险因素。

综上所述, miR-125a-5p 在胃癌组织和胃癌细胞系中呈低表达, 且 miR-125a-5p 低表达与胃癌患者临床病理及不良预后密切相关, 通过上调 miR-125a-5p 的表达靶向下调 BAG4 水平能够抑制胃癌细胞的迁移和侵袭。miR-125a-5p 有望成为预测胃癌预后的标志物, 为胃癌的治疗提供新靶点。

## [参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [3] VAN CUTSEM E, SAGAERT X, TOPAL B, et al. Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2016, 388(10060): 2654-2664. DOI: 10.1016/s0140-6736(16)30354-3.
- [4] ESTELLER M. Non-coding RNAs in human disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(12): 861-874. DOI: 10.1038/nrg3074.
- [5] DI LEVA G, CROCE C M. miRNA profiling of cancer[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2013, 23(1): 3-11. DOI: 10.1016/j.gde.2013.01.004.
- [6] XU Y, HUANG Z, LIU Y. Reduced miR-125a-5p expression is associated with gastric carcinogenesis through the targeting of E2F3 [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(5): 2601-2608. DOI: 10.3892/mmr.2014.2567.
- [7] YAN L, YU M C, GAO G L, et al. MiR-125a-5p functions as a tumour suppressor in breast cancer by downregulating BAP1[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(11): 8773-8783. DOI: 10.1002/jcb.27124.
- [8] ZHU W Y, LUO B, AN J Y, et al. Differential expression of miR-125a-5p and let-7e predicts the progression and prognosis of non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Invest*, 2014, 32(8): 394-401. DOI: 10.3109/07357907.2014.922569.
- [9] LI G, AO S, HOU J, LYU G. Low expression of miR-125a-5p is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(2): 1483-1490. DOI: 10.3892/ol.2019.10423.
- [10] YE H, ZHU W, MEI L, LU Z. Prognostic and clinicopathologic significance of microRNA-125a-5p in cancers: A meta-analysis[J]. *Medicine*, 2019, 98(31): e16685[2021-03-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31374052/>. DOI: 10.1097/md.0000000000016685.
- [11] CAO Y, TAN S, TU Y, et al. MicroRNA-125a-5p inhibits invasion and metastasis of gastric cancer cells by targeting BRMS1 expression[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 5119-5130. DOI: 10.3892/ol.2018.7983.
- [12] RAHMAN P, HUYSMANS R D, WIRADAJA F, et al. Silencer of death domains (SODD) inhibits skeletal muscle and kidney enriched inositol 5-phosphatase (SKIP) and regulates phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling to the actin cytoskeleton[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(34): 29758-29770. DOI: 10.1074/jbc.M111.263103.
- [13] YI L, LV Z, WANG J, ZHONG X. Bcl-2 associated athanogene 4 promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 3753-3760. DOI: 10.3892/mmr.2017.7073.



- [14] KIM V N, HAN J, SIOMI M C. Biogenesis of small RNAs in animals[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(2): 126-139. DOI: 10.1038/nrm2632.
- [15] BRACKEN C P, SCOTT H S, GOODALL G J. A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer[J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(12): 719-732. DOI: 10.1038/nrg.2016.134.
- [16] PASQUINELLI A E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(4): 271-282. DOI: 10.1038/nrg3162.
- [17] NISHIDA N, MIMORI K, FABBRI M, et al. MicroRNA-125a-5p is an independent prognostic factor in gastric cancer and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells in combination with trastuzumab[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9): 2725-2733. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-10-2132.
- [18] YUAN J, XIAO G, PENG G, et al. MiRNA-125a-5p inhibits glioblastoma cell proliferation and promotes cell differentiation by targeting TAZ[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 457(2): 171-176. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.12.078.
- [19] HASSON S A, KANE L A, YAMANO K, et al. High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy[J]. *Nature*, 2013, 504(7479): 291-295. DOI: 10.1038/nature12748.
- [20] OZAWA F, FRIESS H, ZIMMERMANN A, et al. Enhanced expression of Silencer of death domains (SODD/BAG-4) in pancreatic cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 271(2): 409-413. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2610.
- [21] ANNUNZIATA C M, KLEINBERG L, DAVIDSON B, et al. BAG-4/SODD and associated antiapoptotic proteins are linked to aggressiveness of epithelial ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(22 Pt 1): 6585-6592. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-07-0327.
- [22] DAVIDSON B, VALBORG REINERTSEN K, TRINH D, et al. BAG-1/SODD, HSP70, and HSP90 are potential prognostic markers of poor survival in node-negative breast carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2016, 54: 64-73. DOI: 10.1016/j.humpath.2016.02.023.
- [23] CISTERNE A, BARAZ R, KHAN N I, et al. Silencer of death domains controls cell death through tumour necrosis factor-receptor 1 and caspase-10 in acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103383[2021-03-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25061812/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0103383.
- [24] RHO J H, LADD J J, LI C I, et al. Protein and glycomic plasma markers for early detection of adenoma and colon cancer[J]. *Gut*, 2018, 67(3): 473-484. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312794.

[收稿日期] 2021-02-05

[修回日期] 2021-06-04

[本文编辑] 韩丹