

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.01.004

· 基础研究 ·

## miR-875-5p 通过靶向 USF2 抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭

高慎硕<sup>1</sup>, 张智凯<sup>1</sup>, 尹国庆<sup>2</sup>, 张红霞<sup>1</sup>, 王绪斌<sup>3</sup>, 马岩<sup>1</sup>, 刘洪俊<sup>1</sup>, 李乐平<sup>1</sup>, 郭晓波<sup>1</sup> (1. 山东大学附属省立医院 胃肠外科, 山东 济南 250021; 2. 山东第一医科大学附属青州医院 胃肠外科, 山东 青州 262500; 3. 山东第一医科大学 临床医学院, 山东 济南 250117)

**[摘要]** **目的:** 探讨 miR-875-5p 对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其机制。**方法:** 采用 qPCR 法检测胃癌细胞 BGC-823、HGC-27、MGC-803、SGC-7901、AGS、MKN-45 和胃黏膜上皮细胞 GES-1 中 miR-875-5p 的表达水平。利用脂质体转染技术, 分别将 miR-875-5p 模拟物/抑制剂(mimic/inhibitor)及其阴性对照质粒(miR-NC/Anti-miR-NC)转染至 AGS 细胞/MKN-45 细胞, 构建过表达/抑制 miR-875-5p 的细胞模型, 空白对照组(Control 组)不转染。通过 CCK-8、克隆形成、Transwell 等实验分别检测 miR-875-5p 表达变化对细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭的影响。采用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-875-5p 与上游刺激因子 2(USF2)的靶向关系, WB 实验验证 miR-875-5p 对 USF2 的调控作用并检测 USF2 蛋白的表达。构建 MKN-45 细胞裸鼠移植瘤模型, 验证 miR-875-5p 过表达对 MKN-45 细胞成瘤能力的影响。**结果:** miR-875-5p 在 6 种胃癌细胞中表达水平显著低于胃黏膜上皮细胞 GES-1(均  $P < 0.01$ )。与 Control 组和 miR-NC 组相比, miR-875-5p mimic 组 AGS 细胞的增殖、克隆形成率、迁移和侵袭细胞数, 以及 USF2 蛋白的表达均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); miR-875-5p inhibitor 组 MKN-45 细胞的增殖、克隆形成率、迁移和侵袭细胞数, 以及 USF2 蛋白的表达均显著提高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。双荧光素酶报告基因实验证明, miR-875-5p 能够直接靶向 USF2 基因。体内成瘤实验结果表明, 过表达 miR-875-5p 显著抑制 MKN-45 细胞移植瘤的生长(均  $P < 0.01$ )。**结论:** miR-875-5p 通过靶向 USF2 抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

**[关键词]** 胃癌; AGS 细胞; MKN-45 细胞; miR-875-5p; 上游刺激因子 2; 增殖; 迁移; 侵袭

**[中图分类号]** R735.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2022)01-0023-07

## miR-875-5p inhibits the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by targeting USF2

GAO Shenshuo<sup>1</sup>, ZHANG Zhikai<sup>1</sup>, YIN Guoqing<sup>2</sup>, ZHANG Hongxia<sup>1</sup>, WANG Xubin<sup>3</sup>, MA Yan<sup>1</sup>, LIU Hongjun<sup>1</sup>, LI Leping<sup>1</sup>, GUO Xiaobo<sup>1</sup> (1. Department of Gastrointestinal Surgery, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong, China; 2. Department of Gastrointestinal Surgery, Qingzhou Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Qingzhou 262500, Shandong, China; 3. Clinical Medical College, Shandong First Medical University, Jinan 250117, Shandong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of miR-875-5p on proliferation, migration and invasion of gastric cancer (GC) cells and its mechanism. **Methods:** The expression level of miR-875-5p was detected by qPCR in GC cell lines (BGC-823, HGC-27, MGC-803, SGC-7901, AGS, MKN-45) and gastric epithelial GES-1 cells. MiR-875-5p mimics/inhibitors or their negative control plasmids (miR-NC/anti-miR-NC) were transfected into AGS or MKN-45 cells by liposome transfection technique to construct miR-875-5p overexpression or knockdown cell model. Cells in blank control group (Control group) were not transfected. The effects of miR-875-5p on cell proliferation, clone formation, migration and invasion were detected by CCK-8 assay, colony formation assay and Transwell assay, respectively. The targeting relationship between miR-875-5p and upstream stimulatory factor 2 (USF2) was verified by dual-luciferase reporter gene assay. The regulation of miR-875-5p on USF2 as well as the expression of USF2 protein was confirmed by WB assay. After the construction of MKN-45 cell transplanted tumor model in nude mice, the effect of miR-875-5p overexpression on tumorigenesis of MKN-45 cells was detected. **Results:** The expression level of miR-875-5p in 6 GC cells was significantly lower than that in gastric epithelial GES-1 cells (all  $P < 0.01$ ). Compared with Control group and miR-NC group, the proliferation, clone formation rate, number of migrated and invaded cells, and USF2 protein expression level in AGS cells were significantly decreased in miR-875-5p mimic group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), while those were significantly increased in MKN-45 cells of miR-875-5p inhibitor group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Dual-luciferase reporter gene assay demonstrated that miR-875-5p could directly target USF2 gene. *In vivo* tumorigenesis

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No.81672379)

**[作者简介]** 高慎硕(1996—),男,硕士生,主要从事胃肠肿瘤的基础与临床研究, E-mail: 2415695124@qq.com

**[通信作者]** 郭晓波, E-mail: guo992352@hotmail.com

experiment results showed that overexpression of miR-875-5p significantly inhibited the growth of MKN-45 cell transplanted tumors (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** miR-875-5p inhibits proliferation, migration and invasion of GC cells by targeting USF2.

**[Key words]** gastric cancer; AGS cell; MKN-45 cell; miR-875-5p; upstream stimulatory factor 2 (USF2); proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(1): 23-29. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.01.004]

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。在世界范围内胃癌的发病率和病死率分别排名第六位和第二位,每年新发病例超过100万例,死亡72.3万例<sup>[2]</sup>。2020年中国胃癌新发病例47.8万(占全球新发病例的43.9%),死亡37.3万例(占全球死亡病例的48.5%)<sup>[3]</sup>。由于缺乏有效的早期诊断生物标志物,胃癌确诊时往往已经发展到晚期,而晚期或转移性胃癌患者的5年生存率仅为5%~20%。为改善胃癌患者的预后,需要更加有效的早期诊断生物标志物。miRNA是一类小型、高度保守的由内源基因编码的非编码单链RNA分子,长度为19~25个核苷酸,在细胞增殖、迁移、分化、凋亡等过程中起重要作用<sup>[4-5]</sup>。miR-875-5p在许多疾病中均表达异常,包括妊娠期糖尿病、肝纤维化、肺癌、食管癌、肝细胞癌和甲状腺癌等<sup>[6-11]</sup>。上述研究结果表明,miR-875-5p在肿瘤的发生发展中起重要作用。上游刺激因子2(upstream stimulatory factor 2, USF2)在多种恶性肿瘤中异常高表达。目前,miR-875-5p通过调控USF2对胃癌的作用及其机制尚少见文献报道。因此,本研究过表达或抑制miR-875-5p后,检测胃癌细胞生物学特性及USF2蛋白的改变,探讨miR-875-5p对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其潜在的作用机制,旨在为胃癌的早期诊断与治疗提供新的生物标志物与靶标。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、实验动物及主要试剂

人胃癌细胞BGC-823、HGC-27、MGC-803、SGC-7901、MKN-45、AGS和人胃黏膜细胞GES-1购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所。雄性、4~6周龄、16~20 g的BALB/c无胸腺裸鼠购自北京维通利华公司(实验动物合格证号: No.110011211102374973)。

RPMI 1640培养基、Opti-MEM减血清培养基、胎牛血清(FBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)均购自美国Gibco公司,青、链霉素购自上海碧云天公司, RNA抽提试剂TRIzol、逆转录试剂盒、SYBR Green PCR Master Mix购自日本TaKaRa, miR-875-5p模拟物(mimic)和抑制剂(inhibitor)购自上海吉玛生物公司, U6及miR-875-5p引物购自锐博生物公司, 苯甲基磺酰氟(PMSF)购自北京索莱宝科技有限公司, ECL

发光试剂盒购自美国Millipore公司, RIPA蛋白裂解液、BCA蛋白质测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司, USF2抗体、Lipofectamine™ 3000转染试剂购自Invitrogen公司, 兔抗人GAPDH抗体和HRP标记的山羊抗兔二抗购自武汉三鹰公司, Transwell小室和基质胶购自美国Corning公司, CCK-8试剂盒购自美国MCE公司。

### 1.2 细胞培养、转染与分组

细胞用含10%FBS、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的RPMI 1640培养基常规培养。当细胞汇合度达到50%~70%时,参照Lipofectamine™ 3000转染试剂说明书的方法进行转染,将miR-875-5p mimic及阴性对照(miR-NC)、miR-875-5p inhibitor及阴性对照(Anti-miR-NC)分别转染至AGS细胞或MKN-45细胞中,空白对照组(Control组)不转染。实验分为Control组、miR-875-5p mimic组、miR-NC组、miR-875-5p inhibitor组和Anti-miR-NC组。

### 1.3 qPCR法检测胃癌细胞中miR-875-5p的表达水平

细胞转染48 h后,用TRIzol试剂提取培养细胞的RNA,用紫外分光光度计测定RNA浓度及纯度,并将RNA逆转录为cDNA,进行qPCR扩增,U6用作内参照。另外,解链曲线用于评估非特异性扩增。引物序列(5'-3'): miR-875-5p上游为GCGGGC GGTATACCTCAGTTTTAT,下游为ATCCAGTGC AGGGTCCGAGG; U6上游为GGAACGATACAG AGAAGATTAGC,下游为TGGAACGCTTCACGA ATTTGCG。qPCR反应条件:95 °C持续30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s,共进行40个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目的基因miRNA的相对表达量。

### 1.4 双荧光素酶报告基因实验验证miR-875-5p与USF2的靶向关系

通过TargetScan ([http://www.targetscan.org/vert\\_71](http://www.targetscan.org/vert_71))、miRmap (<https://mirmap.ezlab.org/>)和Starbase (<https://starbase.sysu.edu.cn/>)数据库预测miR-875-5p的靶基因,分析miR-875-5p与USF2 mRNA之间的互补结合位点。在含10% FBS的RPMI 1640培养基中培养AGS细胞,按照Lipofectamine™ 3000转染试剂说明书方法,将含psiCHECK2-hUSF2-3'UTR的野生型(WT)和突变型(MUT)报告基因质粒与miR-875-5p mimic或miR-NC共转染至细胞中,培养48 h后,用双荧光素酶活性检测试剂盒检测转染细胞中荧光素酶活性。

### 1.5 WB法检测AGS和MKN-45细胞中USF2蛋白表达水平

细胞转染72 h后,用BCA蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度,用10%SDS-PAGE分离蛋白质(每个样品20 μg),将蛋白质转移到NC膜上。在5%脱脂牛奶中封闭印迹膜30 min后,加入抗USF2(1:1 000)、抗GADPH(1:10 000)一抗,4℃过夜。TBST洗膜后,室温下加入HRP标记的山羊抗兔二抗(1:5 000)中处理1 h。采用增强的化学发光法对蛋白质条带进行曝光,以GADPH用作内参照,使用ImageJ软件分析蛋白条带的灰度值。

### 1.6 克隆形成实验检测AGS和MKN-45细胞的增殖能力

将各组转染后细胞用胰蛋白酶消化,计数并以 $1 \times 10^3$ 细胞的密度重新铺板。每3 d更换一次培养基。10 d后,用PBS洗涤细胞,4%多聚甲醛固定30 min,后用1%结晶紫溶液染色30 min以进行可视化和计数,计算克隆形成率[(克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$ ]。

### 1.7 CCK-8法检测AGS和MKN-45细胞的增殖能力

细胞转染24 h后,按CCK-8试剂盒说明方法,将AGS和MKN-45细胞接种到96孔板( $2.0 \times 10^3$ 个/孔)中,每孔中加入10 μL CCK-8试剂,1 h后上酶标仪检测波长在450 nm处每孔的光密度(D)值,以D值表示细胞增殖能力。

### 1.8 Transwell实验检测AGS和MKN-45细胞的迁移和侵袭能力

细胞转染24 h后,通过胰蛋白酶消化,收集细胞。将Transwell小室置于24孔培养板孔中,将上室和下室分开。在Transwell下室中添加600 μL含20%FBS的RPMI 1640培养基,将250 μL含 $5 \times 10^4$ 个细胞的无血清培养基添加到Transwell上室,进行细胞迁移实验。进行细胞侵袭实验时,使用加入预铺基质胶的上室。在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养24 h后,用棉签除去上室中残留的细胞。侵袭小室基膜的细胞在4%多聚甲醛中固定20 min,1%结晶紫染色20 min后PBS冲洗、封片,在光学显微镜下随机选取5个视野进行观察、计数迁移或侵袭细胞数并拍照。

### 1.9 裸鼠MKN-45细胞移植瘤模型的构建及观察

转染miR-875-5p mimic和miR-NC至MKN-45细胞,将处于对数生长期的 $5 \times 10^5$ 个细胞悬浮在100 μL的PBS中,随后接种到裸鼠的右腋下皮下,实验分为空白对照组、miR-NC组和miR-875-5p mimic组,每组3只。每4 d通过用游标卡尺测量长度(L)和宽度(W)来测量移植瘤的大小,并按照公式 $(L \times W^2) / 2$ 计算移植瘤的体积。28 d后处死裸鼠并剥离移植瘤,测量移植瘤体积。

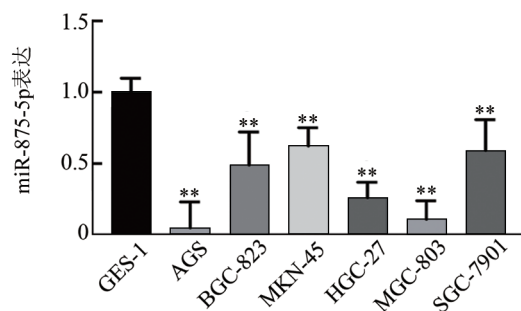
### 1.10 统计学处理

以上所有实验均独立重复3次。采用SPSS 19.0软件进行数据分析,符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-875-5p在胃癌细胞中呈低表达

qPCR法检测结果(图1)显示,与GES-1细胞相比,BGC-823、HGC-27、SGC-7901、MGC-803、MKN-45和AGS细胞中miR-875-5p的表达均显著降低(均 $P < 0.01$ )。结果表明,miR-875-5p在胃癌细胞中呈低表达,以在AGS细胞中表达最低,MKN-45细胞中表达最高,因此,后续实验选择AGS细胞转染miR-875-5p mimic构建过表达细胞,MKN-45细胞转染miR-875-5p inhibitor构建抑制细胞。



与GES-1细胞比较,\*\* $P < 0.01$

图1 miR-875-5p在胃癌细胞和胃黏膜上皮细胞GES-1中的表达

### 2.2 成功构建miR-875-5p过表达或抑制的AGS细胞或MKN-45细胞

转染miR-875-5p mimic或inhibitor后,qPCR法检测结果(图2)表明,与Control组和miR-NC组相比,miR-875-5p mimic组AGS细胞中miR-875-5p的表达水平显著升高(均 $P < 0.01$ );与Control组和Anti-miR-NC组相比,miR-875-5p inhibitor组MKN-45细胞中miR-875-5p的表达水平显著降低(均 $P < 0.01$ )。结果表明,成功构建miR-875-5p过表达或抑制的胃癌细胞,可以进行后续实验。

### 2.3 miR-875-5p靶向USF2基因并抑制其表达

TargetScan、miRmap和Starbase数据库分析结果(图3A)显示,USF2是miR-875-5p的靶基因,其序列中包含一个保守的miR-875-5p mRNA同源位点。双荧光素酶报告基因实验结果(图3B)显示,与miR-NC组相比,miR-875-5p mimic与USF2 WT共转染组细胞的荧光素酶活性明显降低( $P < 0.01$ ),

而 miR-875-5p mimic 与 USF2 MUT 共转染组细胞的荧光素酶活性无变化 ( $P>0.05$ )。WB 法检测结果 (图 3C) 显示, miR-875-5p mimic 组 AGS 细胞中 USF2 蛋白表达显著低于 Control 组和 miR-NC 组

(均  $P<0.01$ ); miR-875-5p inhibitor 组 MKN-45 细胞中 USF2 蛋白表达显著高于 Control 组和 Anti-miR-NC 组 (均  $P<0.05$ )。结果表明, miR-875-5p 直接靶向 USF2 基因并抑制其表达。

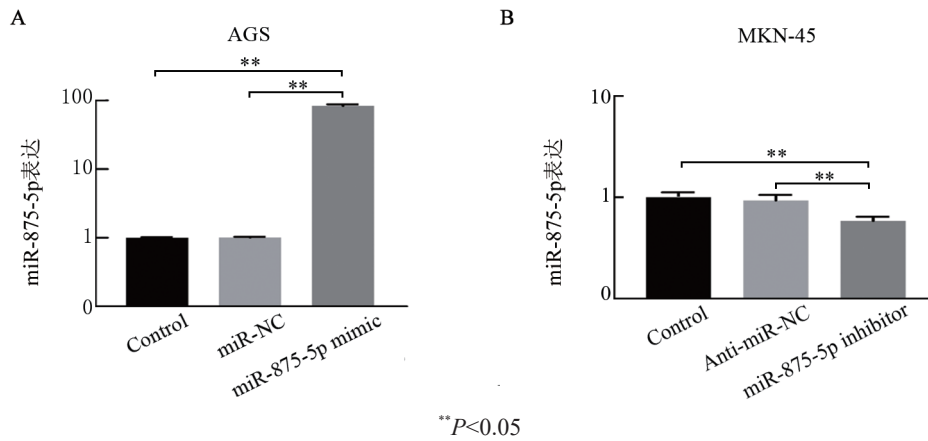
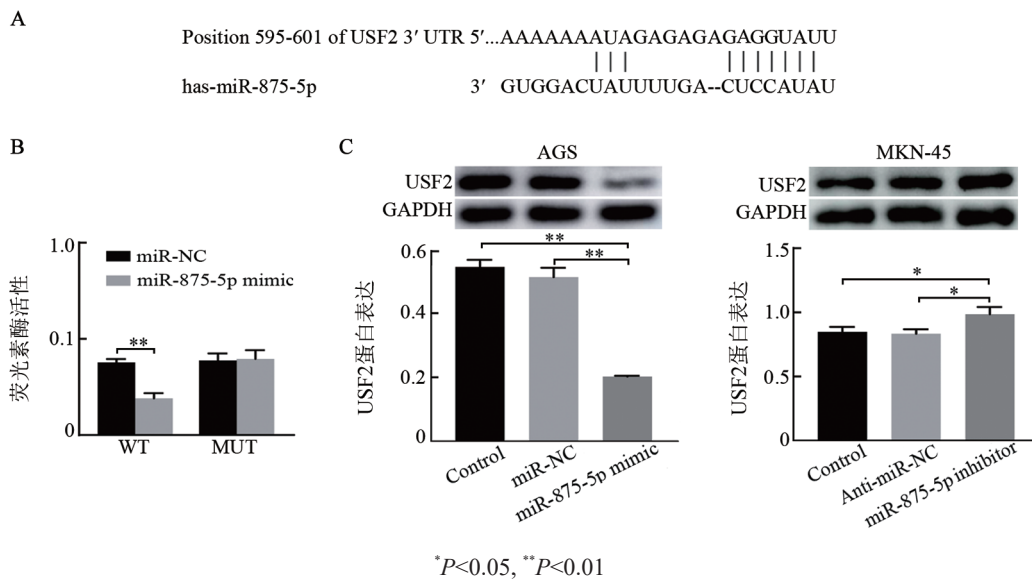


图2 转染 miR-875-5p mimic (A)或 inhibitor (B)后胃癌细胞中 miR-875-5p 表达水平



A: 数据库分析 miR-875-5p 与 USF2 的结合位点; B: 双荧光素酶活性检测; C: WB 法检测 USF2 蛋白的表达

图3 miR-875-5p 靶向抑制 USF2 表达

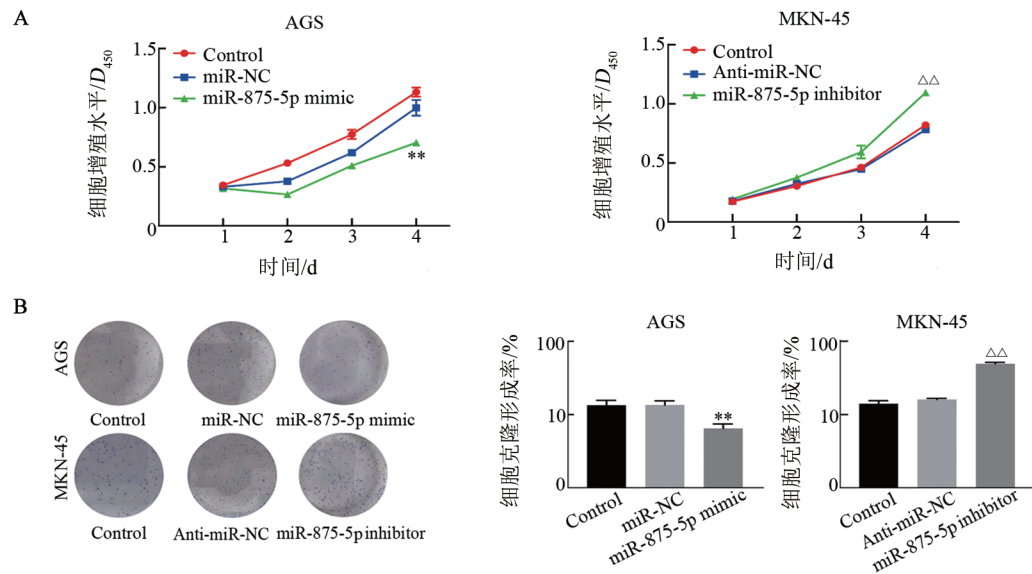
#### 2.4 miR-875-5p 表达变化对胃癌细胞增殖的影响

CCK-8 实验结果 (图 4A) 显示, 在转染第 4 天时 miR-875-5p mimic 组 AGS 细胞的增殖水平显著低于 Control 组和 miR-NC 组 (均  $P<0.01$ ); miR-875-5p inhibitor 组 MKN-45 细胞中的增殖水平显著高于 Control 组和 Anti-miR-NC 组 (均  $P<0.01$ )。克隆形成实验结果 (图 4B) 显示, miR-875-5p mimic 组 AGS 细胞的克隆形成率显著低于 Control 组和 miR-NC 组 (均  $P<0.01$ ); miR-875-5p inhibitor 组 MKN-45 细胞的克隆形成率显著高于 Control 组和 Anti-miR-NC 组细胞 (均  $P<0.01$ )。结果表明, miR-875-5p 过表达显著抑制胃癌

细胞增殖和克隆形成能力。

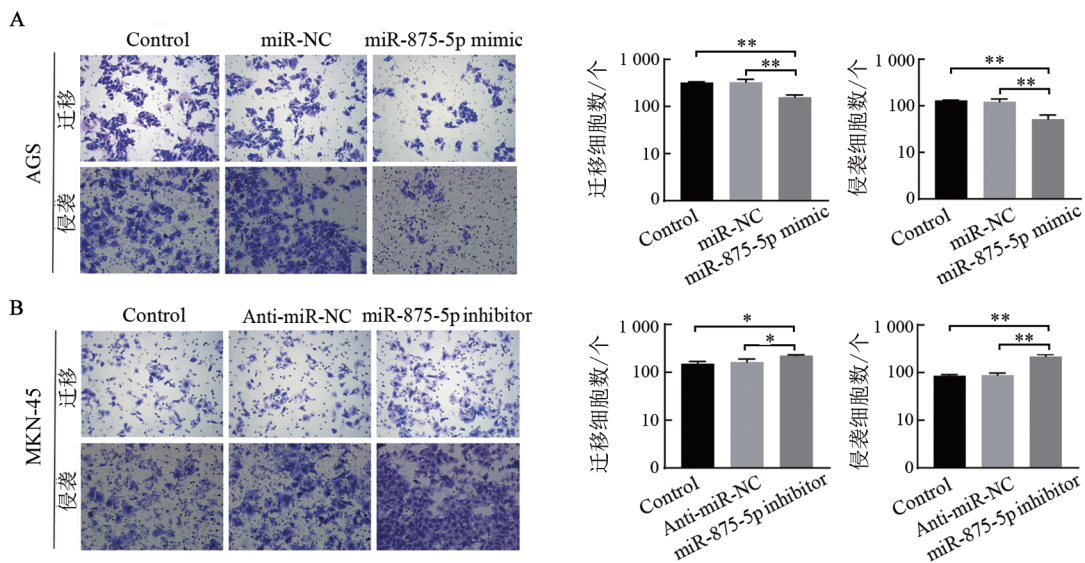
#### 2.5 miR-875-5p 表达变化对胃癌细胞迁移和侵袭的影响

Transwell 实验结果 (图 5) 显示, 与 Control 组和 miR-NC 组相比, miR-875-5p mimic 组 AGS 细胞的迁移和侵袭细胞数均显著减少 (均  $P<0.01$ ); 而 miR-875-5p inhibitor 组 MKN-45 细胞的迁移和侵袭细胞数较 Control 组和 Anti-miR-NC 组均显著增多 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。结果表明, 过表达 miR-875-5p 降低胃癌细胞的迁移与侵袭能力, 抑制 miR-875-5p 表达则提高胃癌细胞的迁移与侵袭能力。



与Control或miR-NC组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与Control或Anti-miR-NC组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

图4 miR-875-5p的过表达或抑制对AGS和MKN-45细胞增殖(A)和克隆形成(B)的影响



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图5 miR-875-5p的过表达或抑制对AGS细胞(A)和MKN-45细胞(B)迁移和侵袭的影响(结晶紫染色,  $\times 200$ )

### 2.6 miR-875-5p过表达显著抑制裸鼠MKN-45细胞移植瘤的生长

裸鼠成瘤实验结果(图6)显示,miR-875-5p mimic组裸鼠移植瘤的体积显著小于Control组和miR-NC组(均 $P < 0.01$ ),表明miR-875-5p过表达可显著抑制裸鼠MKN-45细胞移植瘤的生长。

### 3 讨论

中国胃癌病死率位列恶性肿瘤的第二位,主要是由于胃癌确诊时往往已进展到晚期,失去了早期诊断与疾病治愈的机会。胃癌的生长和转移是一个多基因、多阶段的序贯级联过程,迄今

为止,关于胃癌进展的分子机制研究报道仍然很少。因此,对涉及肿瘤形成和发展的分子机制的更好理解将有助于研发新的治疗策略和靶标来治疗胃癌。在肿瘤的发生和发展过程中,发挥作用的基因分为癌基因和抑癌基因,当这些基因失调时,很可能导致肿瘤的发生。miRNA参与机体的一系列重要的生物学活动,例如早期胚胎发育、细胞增殖、凋亡和分化等。细胞增殖和凋亡通常在肿瘤中发生异常改变,推测miRNA的异常缺失、突变或过表达与恶性肿瘤的发生有关<sup>[12-14]</sup>,miRNA可能是肿瘤诊断的重要生物标志物与治疗靶标。

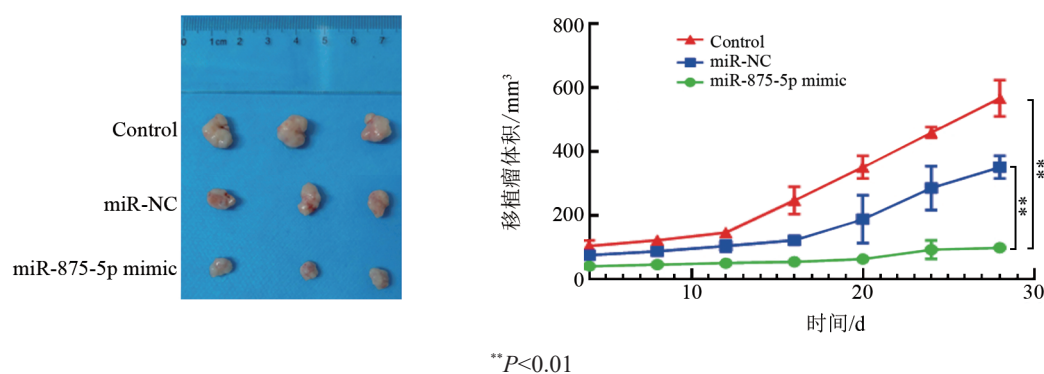


图6 过表达 miR-875-5p 抑制裸鼠成瘤

大量研究结果表明,miR-875-5p参与了肿瘤的发生和发展。如WANG等<sup>[8]</sup>的研究结果显示,miR-875-5p在肺癌中高表达,同时其能调控SATB2(stabilin-2)的表达而发挥促癌作用;KANG等<sup>[9]</sup>的研究结果表明,miR-875-5p通过靶向CAPZA1(capping protein of muscle Z-line alpha 2 subunit)促进食管鳞状细胞癌细胞的增殖和迁移;BEZAWY等<sup>[15]</sup>的研究结果表明,miR-875-5p通过抑制EGFR-ZEB1轴而阻断上皮细胞向间充质细胞的转化,增强前列腺癌细胞的放疗反应。有研究结果<sup>[6]</sup>发现,miR-875-5p过表达可影响胃癌细胞中Notch3的表达从而影响胃癌细胞的增殖。本课题首先检测了miR-875-5p在人胃癌细胞中的表达情况,发现miR-875-5p在胃癌细胞BGC-823、HGC-27、SGC-7901、MGC-803、MKN-45和AGS中的表达水平显著低于正常胃黏膜上皮细胞GES-1。在6种胃癌细胞中,miR-875-5p在AGS细胞中表达最低,而在MKN-45细胞中表达最高,因此,选择AGS和MKN-45细胞进行深入的功能研究。为探讨miR-875-5p对胃癌细胞增殖的影响,进行CCK-8和克隆形成实验,结果表明,miR-875-5p表达的降低提高了胃癌细胞的增殖和集落形成能力,而miR-875-5p过表达则显著抑制细胞增殖和集落形成能力;通过Transwell实验检测miR-875-5p对胃癌细胞侵袭和迁移的作用,结果表明miR-875-5p表达的降低促进细胞的侵袭和迁移,而miR-875-5p过表达显著抑制细胞的侵袭和迁移。

USF2是基本螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链转录因子家族的成员之一,其编码的蛋白质可以参与调节多种细胞过程。作为一个转录因子,USF2已经被报道有大量的靶基因,涉及细胞增殖、葡萄糖和脂质代谢<sup>[17]</sup>。有研究结果<sup>[18-19]</sup>证实USF2在多种肿瘤中高表达,且敲低USF2后肿瘤细胞的增殖和迁移能力明显减弱<sup>[20]</sup>。此外,USF2也受到miRNA的调控,从而影响肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力,例如miR-362-3p通过靶向USF2而抑制结肠癌细胞迁

移<sup>[21]</sup>。本课题组在前期研究<sup>[22]</sup>中发现,miR-875-5p和USF2基因之间存在一定的调控关系。本研究的结果证实,miR-875-5p靶向下调USF2的表达进而抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭。既往的研究结果<sup>[23]</sup>显示,单个miRNA可以同时影响多个靶基因,在miR-875-5p的预测靶基因中,本课题组发现USF2充当miR-875-5p的关键效应靶基因,双荧光素酶报告基因实验和WB实验结果表明,miR-875-5p直接与USF2 mRNA中3'-UTR的靶向位点结合并负向调节USF2表达。miR-875-5p的增殖抑制作用可能归因于miR-875-5p靶向USF2 mRNA的3'-UTR,并抑制胃癌细胞中USF2的表达。此外,裸鼠成瘤实验结果证明,过表达miR-875-5p显著抑制MKN-45细胞的成瘤,这进一步明确了miR-875-5p抑制胃癌细胞增殖的作用。

综上所述,本研究通过使用miR-875-5p mimic和inhibitor转染胃癌细胞,证实了miR-875-5p表达变化可以影响胃癌细胞增殖、迁移和侵袭,过表达miR-875-5p通过靶向下调USF2发挥抑制胃癌生长的作用。本研究结果表明,miR-875-5p可能是胃癌潜在的诊断生物标志物和治疗靶点。

#### [参考文献]

- [1] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, *et al.* Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648. DOI:10.1016/S0140-6736(20)31288-5.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *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. DOI:10.3322/caac.21660.
- [3] CAO W, CHEN H D, YU Y W, *et al.* Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J/OL]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(7): 783-791[2021-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8104205/>. DOI:10.1097/CM9.0000000000001474.
- [4] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297. DOI:10.1016/s0092-8674

- (04)00045-5.
- [5] SALIMINEJAD K, KHORRAM KHORSHID H R, SOLEYMANI FARD S, *et al.* An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451-5465. DOI:10.1002/jcp.27486.
- [6] FU S B, FU S Q, MA X N, *et al.* miR-875-5p regulates IR and inflammation via targeting TXNRD1 in gestational diabetes rats[J/OL]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(5): 303[2021-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7974266/>. DOI:10.3892/mmr.2021.11942.
- [7] YE L, YU Y P, ZHAO Y P. Icarin-induced miR-875-5p attenuates epithelial-mesenchymal transition by targeting hedgehog signaling in liver fibrosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2020, 35(3): 482-491. DOI:10.1111/jgh.14875.
- [8] WANG J, LU Y D, DING H, *et al.* The miR-875-5p inhibits SATB2 to promote the invasion of lung cancer cells[J]. *Gene*, 2018, 644: 13-19. DOI:10.1016/j.gene.2017.11.066.
- [9] KANG N, OU Y W, WANG G C, *et al.* miR-875-5p exerts tumor-promoting function via down-regulation of CAPZA1 in esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *PeerJ*, 2021, 9: e10020[2021-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7792515/>. DOI:10.7717/peerj.10020.
- [10] CHEN T X, SUN L K, YAO B W, *et al.* MicroRNA-875-5p inhibits tumor growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A[J/OL]. *Oncol Rep*, 2020, 44(5): 2067-2079[2021-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7551348/>. DOI:10.3892/or.2020.7743.
- [11] TANG Y, MENG X, YU X, *et al.* Inhibition of microRNA-875-5p promotes radioiodine uptake in poorly differentiated thyroid carcinoma cells by upregulating sodium-iodide symporter[J]. *J Endocrinol Invest*, 2020, 43(4): 439-450. DOI:10.1007/s40618-019-01125-3.
- [12] 邴钟兴, 曹磊, 曹智理, 等. 过表达miR-145-5p通过下调IGF1R抑制食管鳞状细胞TE-10细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(6): 634-639. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.06.007.
- [13] 洪秋双, 王琳, 姜加陶. miR-93通过靶向EphA4激活ERK通路促进非小细胞肺癌细胞的增殖和迁移[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(4): 370-376. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.04.005.
- [14] 郭雪茹, 张其程, 曹丽敏, 等. miR-101通过靶向FGF2抑制非小细胞肺癌的迁移和侵袭[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(9): 984-991. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.09.004.
- [15] EL BEZAWY R, COMINETTI D, FENDERICO N, *et al.* miR-875-5p counteracts epithelial-to-mesenchymal transition and enhances radiation response in prostate cancer through repression of the EGFR-ZEB1 axis[J]. *Cancer Lett*, 2017, 395: 53-62. DOI:10.1016/j.canlet.2017.02.033.
- [16] KANG W, ZHANG J, HUANG T, *et al.* NOTCH3, a crucial target of miR-491-5p/miR-875-5p, promotes gastric carcinogenesis by upregulating PHLDB2 expression and activating Akt pathway[J]. *Oncogene*, 2021, 40(9): 1578-1594. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7932926/>. DOI: 10.1038/s41388-020-01579-3.
- [17] TAN Y W, CHEN Y J, DU M G, *et al.* USF2 inhibits the transcriptional activity of SMURF1 and SMURF2 to promote breast cancer tumorigenesis[J]. *Cell Signal*, 2019, 53: 49-58. DOI: 10.1016/j.cellsig.2018.09.013.
- [18] OCEJO-GARCIA M, BAKOBAH T A, ASHURST H L, *et al.* Roles for USF-2 in lung cancer proliferation and bronchial carcinogenesis [J]. *J Pathol*, 2005, 206(2): 151-159. DOI:10.1002/path.1775.
- [19] LANDA I, RUIZ-LLORENTE S, MONTERO-CONDE C, *et al.* The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors[J/OL]. *PLoS Genet*, 2009, 5(9): e1000637[2021-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2727793/>. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000637
- [20] CHI T F, HORBACH T, GOTZ C, *et al.* Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5)-mediated phosphorylation of upstream stimulatory factor 2 (USF2) contributes to carcinogenesis[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(4): 523[2021-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6521020/>. DOI: 10.3390/cancers11040523.
- [21] CHRISTENSEN L L, TOBIASEN H, HOLM A, *et al.* miRNA-362-3p induces cell cycle arrest through targeting of E2F1, USF2 and PTPN1 and is associated with recurrence of colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(1): 67-78. DOI:10.1002/ijc.28010.
- [22] 周士诚, 孙钦辉, 张红霞, 等. lncRNA C21orf96通过调控miR-875-5p和USF2基因表达促进胃癌细胞的侵袭和转移[J]. *中华普通外科杂志*, 2020, 35(1): 57-60. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-631X.2020.01.000.
- [23] YIN Z Y, WANG W Y, QU G B, *et al.* miRNA-96-5p impacts the progression of breast cancer through targeting FOXO3[J/OL]. *Thorac Cancer*, 2020, 11(4): 956-963[2021-06-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7113053/>. DOI: 10.1111/1759-7714.13348.

[收稿日期] 2021-07-09

[修回日期] 2021-12-03

[本文编辑] 党瑞山