

miR-3188 对胃癌细胞恶性生物学行为的作用及机制研究

王坤男^{1,2,3} 张锦明^{2,3} 张芸^{2,3} 张钧则^{2,3} 袁新普^{2,3} 邹贵军^{2,3} 张朝军^{1,2,3}

摘要 目的 探究 miR-3188 对胃癌细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移的影响及其潜在分子机制。方法 通过 qRT-PCR 法检测正常人胃黏膜细胞(GES-1)及人胃癌细胞系(HGC-27、MGC-803、BGC-823、MKN-45)中 miR-3188 表达水平,通过生物信息学分析及双荧光素酶报告实验确定 NRAGE 是否为 miR-3188 的靶基因,分别将 miR-3188 mimic、miR-3188 inhibitor 及阴性对照物 miR-NC、anti-miR-NC 转染至胃癌细胞 HGC-27 中,通过 Western blot 及 qRT-PCR 法检测 NRAGE 蛋白及 mRNA 表达水平,将 miR-3188 mimic、NRAGE 过表达质粒(pc-NRAGE)及其阴性对照物 miR-NC、pc-control 分别或共转染至胃癌细胞 HGC-27 中,利用 CCK-8、流式细胞术、Transwell 实验检测各组细胞增殖活性、凋亡率、侵袭及迁移的能力,通过 Western blot 检测各组细胞上皮-间质转化(EMT)、增殖、凋亡、侵袭及迁移相关蛋白[细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、基质金属蛋白酶 9(MMP9)、B-cell leukaemia-2 蛋白(Bcl-2)、N 钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、E 钙黏蛋白(E-cadherin)]的表达水平。结果 人胃癌细胞系中 miR-3188 表达水平低于人正常胃黏膜细胞,生物信息学分析及双荧光素酶报告实验证实 miR-3188 可与 NRAGE 3'UTR 靶向结合,Western blot 及 qRT-PCR 证实 miR-3188 负向调控 HGC-27 细胞中 NRAGE 的蛋白表达水平,但不影响其 mRNA 表达水平,与 miR-NC 组相比,转染 miR-3188 mimic 可使 HGC-27 细胞增殖、侵袭及迁移能力降低,细胞凋亡率升高,而共转染 pc-NRAGE 可逆转上述作用;与 miR-NC 组相比,当 HGC-27 细胞中 miR-3188 过表达时,CyclinD1、MMP9、Bcl-2、N-cadherin、Vimentin 表达水平下调,E-cadherin 蛋白表达水平上调,共转染 pc-NRAGE 可逆转上述作用。结论 miR-3188/NRAGE 轴可能在胃癌发展过程中发挥重要作用,miR-3188 可能是潜在的胃癌治疗靶点。

关键词 胃癌; miR-3188; NRAGE; 增殖; 凋亡; 侵袭; 迁移
中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0545-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.008

在全球范围内,胃癌是消化系统最常见恶性肿瘤之一^[1]。在我国其发病率居第二位,是导致癌症相关死亡的重要因素^[2]。随着医学水平不断发展已在一定程度上改善了胃癌患者预后,但晚期胃癌患者尚无有效治疗手段,中位生存期不到 12 个月^[3-4]。因此,探索胃癌发生、发展的分子机制对胃癌防治至关重要。

microRNA 是真核生物中抑制基因表达的内源性非编码 RNA,可调节细胞增殖、凋亡、肿瘤生长等生物学功能^[5]。有研究^[6]证实大多数癌症中存在 miRNA 异常表达。相关研究^[7-10]提示 miR-3188 在多种癌症的发生、发展过程中发挥重要作用。该研究通过生物信息学分析预测 miR-3188 的下游靶基因,通过使用基因干扰技术,观察 miR-3188 通过调控下游靶基因表达对胃癌细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移能力的影响,为探究胃癌进展机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 胃癌细胞系 HGC-27 细胞、胃黏膜细胞系 GES-1 细胞购自广州赛库生物技术有限公司,胃癌细胞系 MGC-803 细胞购自北纳创联生物科技有限公司,BGC-823 细胞、MKN-45 细胞获赠于陆军军医大学生物医学材料学教研室。DMEM 培养基、PBS 缓冲液购自索莱宝科技有限公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco 公司,Lipo-fectamineTM 2000 转染试剂盒及 TRIzol 试剂均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;反转录试剂盒 PrimeScript[®] RT reagent Kit、定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex TaqTM、microRNA 提取试剂盒 Mir-XTM miRNA First-Strand Synthesis and TB Green[®] qRT-PCR User Manual 购自 Takara 公司;miR-3188 mimic、miR-3188 inhibitor、阴性对照以及 pc-control、pc-NRAGE 质粒均由苏州吉玛生物科技有限公司提供,含野生型和突变型 NRAGE 序列的荧光素酶报告基因质粒由上海吉凯基因化学技术有限公司提

2022-03-07 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81972320);解放军总医院第六医学中心院内引进人才基金(编号:YR201503)

作者单位:¹安徽医科大学海医临床学院,合肥 230032

²解放军总医院第六医学中心普通外科,北京 100048

³解放军总医院第一医学中心普通外科学部,北京 100853

作者简介:王坤男,男,硕士研究生;

张朝军,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: zcjdlyxzx@163.com

供; 细胞周期蛋白 D 1(CyclinD 1) ,基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9 ,MMP 9) ,B-cell leuke-2 蛋白(Bcl-2) ,N 钙黏蛋白(N-cadherin) ,波形蛋白(Vimentin) ,E 钙黏蛋白(E-cadherin) ,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或山羊抗鼠 IgG 二抗及电化学发光(ECL) 液购自江苏亲科生物研究中心有限公司; NRAGE 抗体购自 Abcam 公司,双荧光素酶检测报告试剂盒购自美国 Progenia 公司; Transwell 小室、Matrigel 基质胶购自美国 Corning 公司; RIPA、BCA 蛋白定量试剂盒等蛋白免疫印迹实验所需试剂均购自北京阳光英锐生物有限公司; CCK-8 试剂盒购自北仁化学科技(北京) 有限公司,Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自 Miltenyi Biotec 公司。

1.2 细胞转染及分组 细胞系 HGC-27、MGC-803、BGC-823、MKN-45 及 GES-1 放入含有 10% FBS 的 DMEM 培养基,在 37 ℃、5% CO₂、相对湿度 95% 的恒温培养箱内培养。当细胞汇合度到 80% 左右时进行传代。将 HGC-27 细胞分为阴性对照组(miR-NC 组、antimiR-NC 组): 转染对照模拟物、对照抑制物; miR-3188 上调组(miR-3188 组): 转染 miR-3188 mimic; miR-3188 下调组(antimiR-3188 组): 转染 miR-3188 inhibitor; miR-3188 + pc-control 组: 共同转染 miR-3188 mimic 与阴性对照质粒; miR-3188 + pc-NRAGE 组: 共同转染 miR-3188 mimic 与 NRAGE 过表达质粒。将 miRNA 模拟物 NC(miR-NC) 、miRNA 抑制物 NC(antimiR-NC) 、miR-3188 mimic、miR-3188 inhibitor、阴性对照质粒(pc-control) 、NRAGE 过表达质粒(pc-NRAGE) 分别或共同转染至 HGC-27 细胞中,严格按照转染试剂盒说明书进行操作,首先将细胞均匀接种至 6 孔板中,待细胞汇合度至 40% 左右时,使用 Lipofectamine™ 2000 试剂进行细胞转染,转染 48 ~ 72 h 后进行后续实验。

1.3 qRT-PCR 检测细胞中 miR-3188 及 NRAGE mRNA 表达水平 采用 TRIzol 提取细胞总 RNA 后进行反转录。根据 SYBR Premix Ex Taq™、Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis and TB Green® qRT-PCR User Manual 说明书进行 qRT-PCR 检测。miR-3188 以 U6 为内参基因,NRAGE 以 GAPDH 为内参基因,用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 miR-3188 和 NRAGE mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

1.4 生物信息学分析 使用基因预测网站 TargetScan(www.targetscan.org) 预测 miR-3188 的下游靶基因,从 TCGA 数据库(https://cancergenome.

表 1 引物序列

基因名	引物序列
miR-3188	5'-AGAGGCTTTGTGCGGATACGGGG-3'
NRAGE	F: 5'-TTCCAGGCTGACATAGAGA-3' R: 5'-TCTGATCCCCACTGCTGTCT-3'
U6	F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
GAPDH	F: 5'-CAAGTCATCCATGACAACCTTTG-3' R: 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'

nih.gov) 下载胃癌患者的基因表达数据并分析 miR-3188 与所预测靶基因表达的相关性。

1.5 双荧光素酶报告实验 利用生物信息分析数据库(TargetScan) 预测 NRAGE mRNA 的 3'UTR 存在 miR-3188 的结合位点,分别构建重组荧光素酶报告基因质粒 pGL3-NRAGE-3'UTR(WT-NRAGE) 及突变荧光素酶报告基因质粒 pGL3-NRAGE-3'UTR(MUT-NRAGE) ,按照转染试剂说明将 WT-NRAGE 和 MUT-NRAGE 转染至细胞中,同时将 miR-control 或 miR-3188 mimic 转入各组细胞中,转染 48 h 后按照荧光素酶检测试剂盒说明书检测细胞荧光素酶活性。

1.6 Western blot 检测转染后 HGC-27 细胞中 NRAGE、CyclinD 1、Bcl-2、MMP 9 及 EMT 相关蛋白表达 收集各组对数生长期细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,加入 RIPA 裂解液,经 12 000 r/min 离心 10 min 后吸取上清液,测定蛋白浓度后各蛋白样品分别加入 5 倍上样缓冲液,金属浴变性 5 min。取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳实验(80 V 20 min; 120 V 90 min) ,电泳结束后转移至 PVDF 膜,将 PVDF 膜剪裁为合适大小,室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入各蛋白一抗(除 GAPDH 稀释比例为 1 : 5 000 外,其余蛋白一抗稀释比例均为 1 : 1 000) ,4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次 5 min/次,加入二抗(稀释比例 1 : 8 000) 于室温条件下孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次 5 min/次,加入 ECL 化学发光试剂进行曝光拍照。

1.7 CCK-8 法检测 HGC-27 细胞增殖率 将各组细胞经胰蛋白酶消化后重新调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml,以 5 000 个/孔的密度将细胞接种至 96 孔板内,每组设置 6 个复孔。分别在培养 48、72 h 后,每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂,于细胞培养箱内孵育 1 h,使用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度(optical density, OD) 值。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡情况 各组细胞经 PBS 洗涤、胰蛋白酶消化后重悬调整细胞浓度为

1 × 10⁶ 个/ml, 收集细胞后加入 1 ml 1 × binding Buffer 洗涤两次后, 加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀、室温下避光孵育 15 min, 使用 1 ml 1 × Binding Buffer 洗涤细胞, 重悬细胞加入 5 μl PI 后使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

1.9 Transwell 实验检测 HGC-27 细胞侵袭和迁移能力 预备: 将基质胶至于 4 °C 冰箱内过夜解冻, 次日使用无血清 DMEM 培养基将基质胶稀释至 30 mg/ml, 取 100 μl 稀释液置于 Transwell 小室上室; 细胞处理: 收集各组处于对数生长期的 HGC-27 细胞, 胰蛋白酶消化后制备细胞悬液, 调整细胞密度为 5 × 10⁵ 个/ml, 取 100 μl 细胞悬液置于铺满基质胶的 Transwell 小室的上室; 恒温细胞培养箱内孵育 24 h 后用沾有 PBS 的棉签除去基质胶及 Transwell 小室的上室细胞, 用多聚甲醛固定 20 min, 结晶紫溶液染色 20 min, 在显微镜下随机选取 5 个视野计数。细胞迁移实验: 除去制备基质胶实验步骤外, 其余实验步骤均与细胞侵袭实验相同。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据统计分析及制图。本研究统计数据均采用均值 ± 标准差进行表示。两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 双连续变量相关性分析采用 Pearson 检验。当 *P* < 0.05 时, 说明数据差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃黏膜细胞及胃癌细胞中 miR-3188 的表达水平 qRT-PCR 实验结果显示, miR-3188 在 HGC-27、MGC-803、BGC-823、MKN-45 中的相对表达量低于 GES-1, 其中 HGC-27 细胞中 miR-3188 相对表达量最低, 选择 HGC-27 细胞进行后续实验, 胃黏膜细胞同胃癌细胞系中的 miR-3188 相对表达量差异有统计学意义 (*F* = 362, *P* < 0.001), 见图 1。

2.2 miR-3188 靶向调控胃癌细胞中 NRAGE 的表达 生物信息分析数据库 (TargetScan) 预测 NRAGE 可能是 miR-3188 的靶基因, 使用 TCGA 数据库进行数据挖掘, Spearman 相关分析提示在胃癌中 NRAGE 的表达量与 miR-3188 表达量呈负相关 ($\rho = -0.22, P < 0.05$), 见图 2A。双荧光素酶报告实验显示, 在 WT-NRAGE 转染的细胞中, 与 miR-control 转染组细胞相比较, miR-3188 mimic 转染组的细胞荧光素酶活性降低, 差异有统计学意义 (*F* = 1.791, *P* < 0.01), 共转染 MUT-NRAGE 与 miR-3188 mimic 的细胞荧光素酶活性未见改变, 差异无统计学意义

(*F* = 1.388, *P* > 0.05), 见图 2B。Western blot 检测转染 miR-3188 mimic、miR-3188 inhibitor 及其阴性对照物 miR-NC、anti-miR-NC 的 HGC-27 细胞中

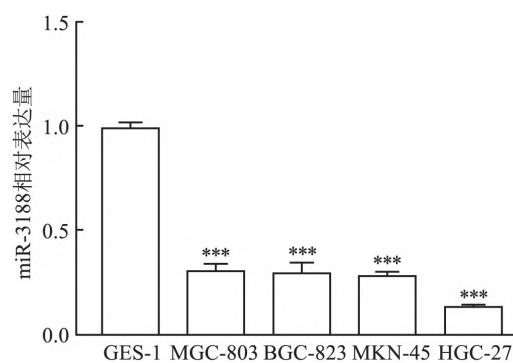


图 1 qRT-PCR 检测正常胃黏膜细胞及胃癌细胞系中 miR-3188 表达与正常胃黏膜细胞 GES-1 比较: *** *P* < 0.001

A NRAGE 5'-...CCCUGUGUGAGGCUGAAGCCUCA...-3'
miR-3188 GGGGCAUAGGCGUGUUUCGGAGA

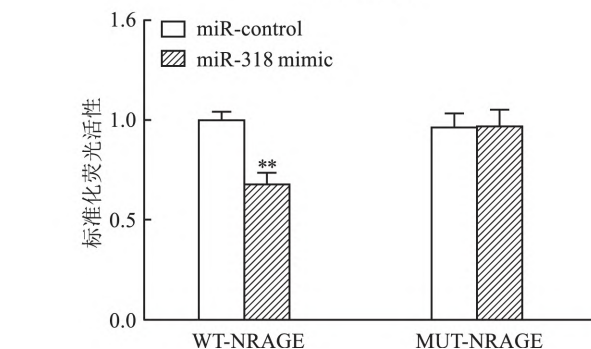
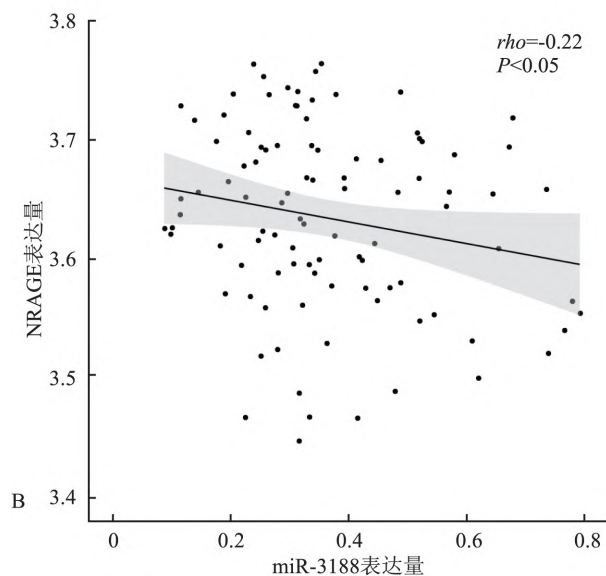


图 2 miR-3188 在 HGC-27 细胞中与 NRAGE 3 的靶向关系

A: 生物信息学分析预测 miR-3188 与 NRAGE 3'-UTR 的结合位点及在胃癌组织中 miR-3188 与 NRAGE 表达水平的相关性; B: 双荧光素酶报告实验验证 miR-3188 的靶基因; 与 WT-NRAGE + miR-control 比较: ** *P* < 0.01

NRAGE 蛋白的表达水平,结果显示转染 miR-3188 mimic 的 HGC-27 细胞中 miR-3188 组 NRAGE 蛋白表达水平低于 miR-NC 组,而转染 miR-3188 inhibitor 的 HGC-27 细胞中 anti-miR-3188 组 NRAGE 蛋白表达水平高于 anti-miR-NC 组。qRT-PCR 检测结果显示,各组 NRAGE mRNA 表达水平差异无统计学意义($F = 24.08, P > 0.05$),见图 3。

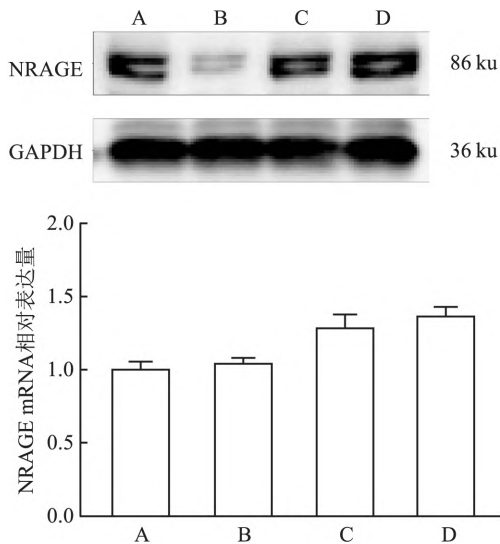


图3 miR-3188 对 HGC-27 细胞 NRAGE 蛋白及 mRNA 表达水平的影响

A: miR-NC 组; B: miR-3188 组; C: anti-miR-NC 组; D: anti-miR-3188 组

2.3 miR-3188 通过调控 NRAGE 表达抑制 HGC-27 细胞增殖 CCK-8 实验结果显示,转染 48 h 时,同 miR-NC 组相比,miR-3188 组细胞增殖率降低,差异有统计学意义($F = 14.504, P < 0.001$),而 miR-3188 mimic + pc-NRAGE 组的细胞增殖率高于 miR-3188 mimic + pc-control 组,差异有统计学意义($F = 2.630, P < 0.001$);转染 72 h 时,同 miR-NC 组相比,miR-3188 mimic 组细胞增殖率降低,差异有统计学意义($F = 8.301, P < 0.001$),而 miR-3188 mimic + pc-NRAGE 组的细胞增殖率高于 miR-3188 mimic + pc-control 组,差异有统计学意义($F = 2.125, P < 0.001$),见图 4。

2.4 miR-3188 通过调控 NRAGE 表达促进 HGC-27 细胞凋亡 流式细胞术实验结果提示,同 miR-NC 组相比,miR-3188 组的细胞凋亡率增加,差异有统计学意义($F = 16.735, P < 0.001$),而 miR-3188 + pc-NRAGE 组细胞凋亡率低于 miR-3188 + pc-control 组,差异有统计学意义($F = 1.96, P < 0.01$),见图 5。

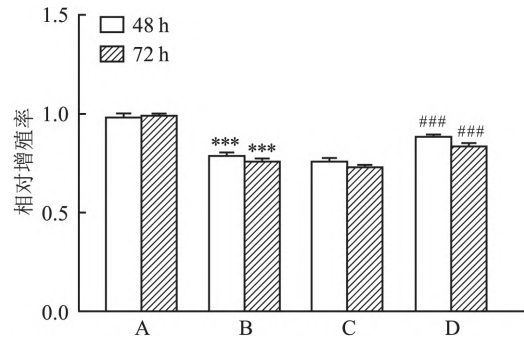


图4 miR-3188 靶向 NRAGE 对 HGC-27 细胞增殖的影响

与 miR-NC 组比较:*** $P < 0.001$;与 miR-3188 + pc-control 组比较:### $P < 0.001$;A: miR-NC 组;B: miR-3188 组;C: miR-3188 + pc-control 组;D: miR-3188 + pc-NRAGE 组

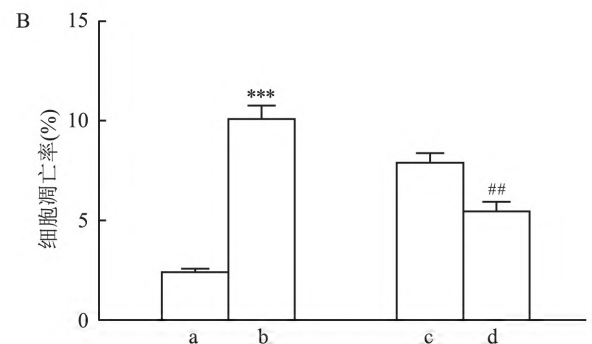
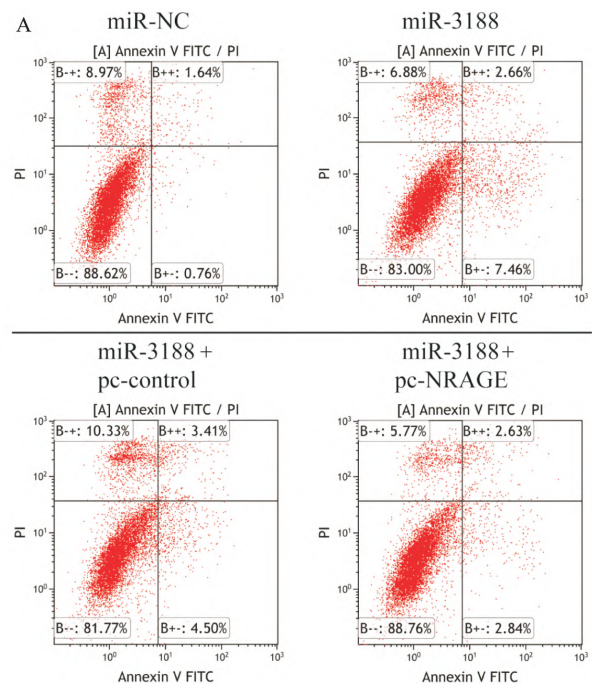


图5 miR-3188 靶向 NRAGE 对 HGC-27 细胞凋亡的影响

A: 流式细胞术检测各组细胞凋亡率变化; B: 与 miR-NC 组比较:*** $P < 0.001$;与 miR-3188 + pc-control 组比较:## $P < 0.01$;a: miR-NC 组;b: miR-3188 组;c: miR-3188 + pc-control 组;d: miR-3188 + pc-NRAGE 组

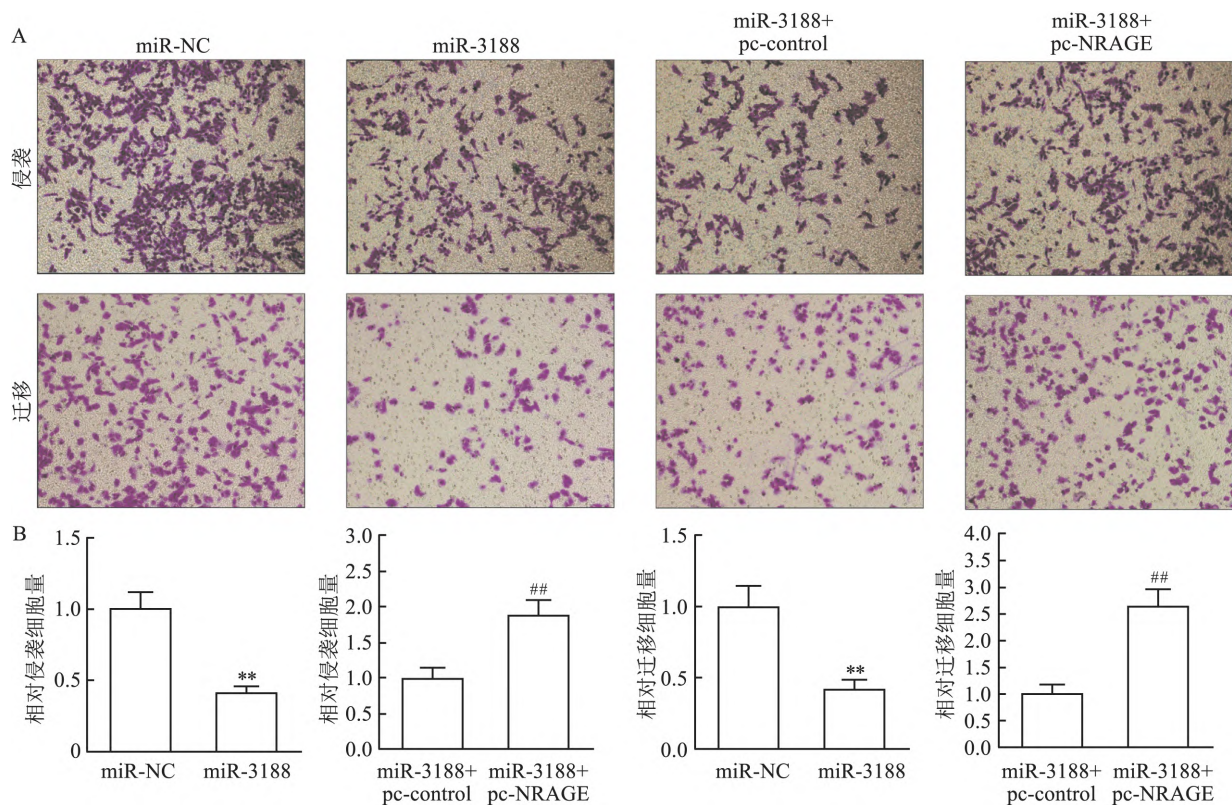


图6 miR-3188 靶向 NRAGE 对 HGC-27 细胞侵袭、迁移能力的影响 ×200

与 miR-NC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 miR-3188 + pc-control 组比较: ## $P < 0.01$

2.5 miR-3188 通过调控 NRAGE 表达抑制 HGC-27

细胞侵袭及迁移能力 Transwell 实验结果提示, 同 miR-NC 组相比, miR-3188 组各视野下的细胞侵袭数下降, 差异有统计学意义 ($F = 5.760, P < 0.01$), 各视野下的细胞迁移数下降, 差异有统计学意义 ($F = 4.590, P < 0.01$); 同 miR-3188 + pc-control 相比, miR-3188 + pc-NRAGE 组各视野下细胞侵袭数升高, 差异有统计学意义 ($F = 2.151, P < 0.01$), 各视野下细胞迁移数升高, 差异有统计学意义 ($F = 3.361, P < 0.01$), 见图 6。

2.6 miR-3188 通过调控 NRAGE 表达抑制 HGC-27 细胞的增殖、凋亡、转移、EMT 相关蛋白的表达

Western blot 结果显示, miR-3188 组的 N-cadherin、Vimentin、CyclinD 1、Bcl-2、MMP 9 蛋白表达水平低于 miR-NC 组, 而 miR-3188 + pc-NRAGE 组 N-cadherin、Vimentin、CyclinD 1、Bcl-2、MMP 9 的表达水平高于 miR-3188 + pc-control 组, 同时 miR-3188 组 E-cadherin 蛋白表达水平高于 miR-NC 组, 而 miR-3188 + pc-NRAGE 组 E-cadherin 蛋白表达水平低于 miR-3188 mimic + pc-control 组, 见图 7。

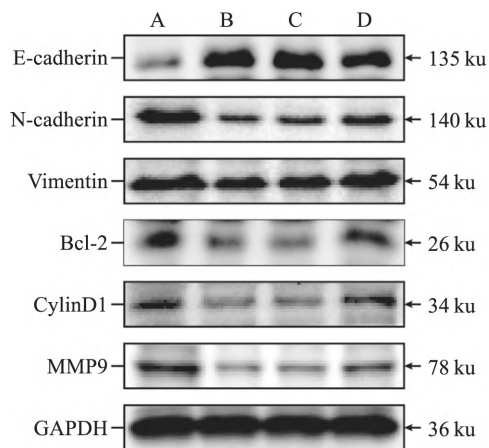


图7 miR-3188 靶向调控 NRAGE 对 HGC-27 细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移、EMT 相关蛋白表达影响

A: miR-NC 组; B: miR-3188 组; C: miR-3188 + pc-control 组; D: miR-3188 + pc-NRAGE 组

3 讨论

胃癌是当前威胁人类生命健康的常见恶性肿瘤之一, 探索胃癌的发病机制及寻找潜在治疗靶点仍是需要解决的重要难题。大量研究已经证实 miR-

NA 在众多癌症当中存在异常表达,其在癌症的诊断及治疗方面的价值不言而喻,同时越来越多的研究亦表明 miRNA 密切参与调控胃癌的发展过程。例如,miR-505 可通过靶向调控 HMGB 1 抑制胃癌细胞增殖并促进胃癌细胞凋亡^[11]。相反,miR-532 可靶向调控 NKD 1 促进胃癌细胞的迁移和侵袭^[12]。miRNA 在胃癌发展过程中可扮演多种角色并发挥重要作用,因此研究 miRNA 对胃癌细胞的生物学行为的影响对探索胃癌发病机制及发展过程具有重要意义。

有研究^[7]证实 miR-3188 在不同癌症当中发挥重要作用,例如在鼻咽癌中,miR-3188 可作为肿瘤抑制因子直接靶向 mTOR 参与 FOXO 1 介导的细胞生长抑制,肿瘤发生和鼻咽癌化疗耐药。miR-3188 在头颈部癌(HNC)细胞系、组织来源的外泌体及其亲本癌症相关成纤维细胞(CAFs)中低表达,外泌体内的 miR-3188 可通过靶向 Bcl-2 影响 HNC 细胞的增殖和凋亡^[8]。miR-3188 在非小细胞肺癌(NSCLC)细胞中通过 mTOR/PI3K/AKT/c-jun 信号通路与 FOXO 1 相互作用从而抑制 NSCLC 细胞增殖^[9]。相反,miR-3188 在乳腺癌组织和细胞中表达上调,并可通过抑制 p 27 促进乳腺癌细胞增殖^[10]。本研究结果显示 miR-3188 在胃癌细胞中的表达量低于正常胃黏膜细胞,通过在胃癌细胞 HGC-27 中转染 miR-3188 mimic,并进行 CCK-8 实验、流式细胞术、Transwell 实验,实验结果显示在胃癌细胞 HGC-27 中过表达 miR-3188 能够抑制胃癌细胞的增殖、侵袭、迁移并促进其发生凋亡,miR-3188 可能在胃癌发展过程中发挥抑癌作用。

本研究通过生物信息学分析预测 NRAGE 可能是 miR-3188 的靶基因,有研究^[13]表明,在胃癌组织中 NRAGE 表达上调与 TNM 分期、局部浸润和预后不良相关。此外,荧光素酶报告实验结果显示,在 WT-NRAGE 转染的细胞中,miR-3188 过表达降低荧光素酶活性,而在 MUT-NRAGE 转染的细胞中,则未见荧光素酶活性降低,该结果显示 NRAGE 是 miR-3188 的靶基因。通过在胃癌细胞 HGC-27 中分别转染 miR-3188 mimic 及 miR-3188 inhibitor,Western blot 及 qRT-PCR 结果显示 miR-3188 可负向调控 NRAGE 蛋白表达,但不影响其 mRNA 表达水平。为进一步探究胃癌细胞中 miR-3188 是否通过调控 NRAGE 发挥抑癌作用,将 pc-control 及 pc-NRAGE 分别转染至 miR-3188 过表达的 HGC-27 细胞中,CCK-8 实验、流式细胞术、Transwell 结果显示转染

pc-NRAGE 可逆转 miR-3188 对胃癌细胞 HGC-27 增殖、侵袭及迁移能力的抑制作用,并减少细胞凋亡。CyclinD 1、Bcl-2、MMP 9 分别是细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移生物学行为的重要标志蛋白^[14-15]。Western blot 结果提示 miR-3188/NRAGE 轴可能通过干扰上述蛋白表达而抑制胃癌细胞发展。EMT 机制在肿瘤的侵袭、转移过程中发挥重要作用,E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 等蛋白是 EMT 的标志蛋白^[15]。本研究结果显示胃癌细胞 HGC-27 中 miR-3188 过表达可通过抑制 NRAGE 表达导致 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达下调同时促进 E-cadherin 蛋白表达。这一结果提示在胃癌细胞 HGC-27 中,miR-3188 可能通过靶向调控 NRAGE 抑制 EMT 进程。

综上所述,miR-3188 过表达可抑制胃癌细胞的生长,其作用机制可能与通过靶向调控 NRAGE 的表达有关,该研究结果为探索胃癌发展机制及找寻新的胃癌治疗靶点提供了实验依据。

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.
- [2] 曹毛毛, 陈万青. 中国恶性肿瘤流行情况及防控现状 [J]. *中国肿瘤临床*, 2019, 46(3): 145-9.
- [3] Machlowska J, Baj J, Sitarz M, et al. Gastric cancer: Epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4012.
- [4] Digkila A, Wagner A D. Advanced gastric cancer: Current treatment landscape and future perspectives [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(8): 2403-14.
- [5] Chi Y, Zhou D. MicroRNAs in colorectal carcinoma—from pathogenesis to therapy [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 43.
- [6] Rupaimoole R, Slack F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 203-22.
- [7] Zhao M, Luo R, Liu Y, et al. miR-3188 regulates nasopharyngeal carcinoma proliferation and chemosensitivity through a FOXO1-mediated positive feedback loop with mTOR-p-PI3K/AKT-c-JUN [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11309.
- [8] Wang X, Qin X, Yan M, et al. Loss of exosomal miR-3188 in cancer-associated fibroblasts contributes to HNC progression [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 151.
- [9] Wang C, Liu E, Li W, et al. MiR-3188 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation through FOXO1-mediated mTOR-p-PI3K/AKT-c-JUN signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1362.

- [10] Chen X, Chen J. miR-3188 regulates cell proliferation, apoptosis, and migration in breast cancer by targeting TUSC5 and regulating the p38 MAPK signaling pathway [J]. *Oncol Res*, 2018, 26(3): 363–72.
- [11] Tian L, Wang Z Y, Hao J, et al. miR-505 acts as a tumor suppressor in gastric cancer progression through targeting HMGB1 [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 120(5): 8044–52.
- [12] Hu S, Zheng Q, Wu H, et al. miR-532 promoted gastric cancer migration and invasion by targeting NKD1 [J]. *Life Sci*, 2017, 177: 15–9.
- [13] Jiang X, Jiang X, Yang Z. NRAGE confers poor prognosis and promotes proliferation, invasion, and chemoresistance in gastric cancer [J]. *Gene*, 2018, 668: 114–20.
- [14] Wei X, Liu W, Wang J Q, et al. “Hedgehog pathway”: a potential target of itraconazole in the treatment of cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146(2): 297–304.
- [15] Scheau C, Badarau I A, Costache R, et al. The role of matrix metalloproteinases in the epithelial–mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma [J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2019, 2019: 9423907.

Effect and mechanism of miR-3188 on malignant biological behavior of gastric cancer cell

Wang Kunnan^{1,2,3}, Zhang Jinming^{2,3}, Zhang Yun^{2,3}, Zhang Junze^{2,3},
Yuan Xinpu^{2,3}, Zou Guijun^{2,3}, Zhang Chaojun^{1,2,3}

(¹Naval Clinical College, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of General Surgery, The Sixth Medical Centre, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048; ³Dept of General Surgery, The First Medical Centre, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853)

Abstract Objective To explore the effect of miR-3188 on the proliferation, apoptosis, invasion and migration of gastric cancer cells and the underlying molecular mechanism. **Methods** The expression level of miR-3188 was examined in normal human gastric mucosal cells (GES-1) and human gastric cancer cell lines (HGC-27, MGC-803, BGC-823, MKN-45) by qRT-PCR. It was determined by bioinformatic analysis and dual luciferase reporter assay whether NRAGE was the target gene of miR-3188. miR-3188 mimic, miR-3188 inhibitor and negative control miR-NC were transfected into gastric cancer cell line HGC-27 respectively, and the expression of NRAGE on protein and mRNA levels was detected by Western blot and qRT-PCR. miR-3188 mimic, NRAGE overexpression plasmid (pc-NRAGE) and its negative control (miR-NC, pc-control) were separately or co-transfected into gastric cancer cell line HGC-27. CCK-8, flow cytometry and Transwell experiment were used to detect cell proliferation, apoptosis, invasion and migration in each group. The expressions of epithelial-mesenchymal transition (EMT), proliferation, apoptosis, invasion and migration related proteins [CyclinD1, matrix metalloproteinase 9 (MMP9), Bcl-2, N-cadherin, Vimentin, E-cadherin] in each group were detected by Western blot. **Results** The expression of miR-3188 in human gastric cancer cell lines was lower than that of human normal gastric mucosal cells. Bioinformatics analysis and dual luciferase reporter assay confirmed that miR-3188 could target and bind to NRAGE 3'UTR. Western blot and qRT-PCR confirmed that miR-3188 negatively regulated the expression of NRAGE on the protein level in HGC-27 cells, but not on the mRNA level. Compared with the miR-NC group, Transfected miR-3188 mimic reduced the proliferation, invasion and migration ability of HGC-27 cells, and increased the apoptosis rate, and the co-transfection of pc-NRAGE could reverse the above effects. Compared with the miR-NC group, when miR-3188 was overexpressed in HGC-27 cell, the expression of cyclinD1, MMP9, Bcl-2, N-cadherin, and Vimentin was down regulated, while E-cadherin expression was up-regulated, and the above effects could be reversed by co-transfection with pc-NRAGE. **Conclusion** The miR-3188/NRAGE axis may play important roles in the progression of gastric cancer, and miR-3188 may be a potential therapeutic target for gastric cancer.

Key words gastric cancer; miR-3188; NRAGE; proliferation; apoptosis; invasion; migration