

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.09.004

· 基础研究 ·

miR-153-3p 通过靶向 FZD3 调控胃癌 SGC7901 细胞的增殖、侵袭与迁移

张曹^a, 何亚琴^b, 钱海权^a, 叶晶晶^c (宁夏医科大学总医院 a. 胃肠外科; b. 外科学研究室; c. 心脏中心功能检查部, 宁夏 银川 750001)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-153-3p 对胃癌 SGC7901 细胞增殖、侵袭和迁移的作用及其机制。**方法:** 收集 2018 年 5 月至 2020 年 6 月宁夏医科大学总医院收治的 60 例胃癌患者的癌和配对癌旁组织标本, 以及人胃癌细胞系 NCI-N87、AGS、SNU-5、SGC7901 和胃上皮细胞 GES-1, qPCR 法检测 miR-153-3p 在胃癌组织与细胞中的表达水平。将 miR-153-3p mimic 及 mimic 对照序列转染至 SGC7901 细胞, 用 CCK-8、克隆形成、流式细胞术、TUNEL、Transwell 和划痕愈合实验分别检测上调 miR-153-3p 对 SGC7901 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响。构建裸鼠 SGC7901 细胞移植瘤模型, 观察 miR-153-3p 对肿瘤生长的影响。通过生物信息学数据库和双荧光素酶报告基因实验预测并验证 miR-153-3p 与 FZD3 靶向关系, WB 法检测 miR-153-3p 对 FZD3 蛋白及 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达的影响。**结果:** miR-153-3p 在胃癌组织和细胞中表达水平分别显著低于癌旁组织和 GES-1 细胞 (均 $P < 0.01$), 以 SGC7901 细胞中表达水平最低。上调 miR-153-3p 显著抑制 SGC7901 细胞的增殖、侵袭和迁移能力, 并提高细胞凋亡率 (均 $P < 0.01$), 同时上调细胞中 E-cadherin 表达而下调 N-cadherin、MMP2 和 MMP9 表达 (均 $P < 0.01$)。在体内实验表明, 静脉注射 miR-153-3p mimic 显著降低移植瘤体积和瘤组织中 Ki-67 表达而上调 P57 表达 (均 $P < 0.01$)。机制分析表明, miR-153-3p 靶向结合 FZD3 基因的 3'UTR 区域, 上调 miR-153-3p 会抑制 FZD3 表达并上调 β -catenin、TCF-4 和 cyclin D1 水平 (均 $P < 0.01$)。**结论:** miR-153-3p 靶向 FZD3 并通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控胃癌 SGC7901 细胞的增殖、侵袭和迁移。

[关键词] miR-153-3p; FZD3 基因; 胃癌; SGC7901 细胞; 增殖; 侵袭; 迁移; Wnt/ β -catenin 信号通路

[中图分类号] R735.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)09-0885-08

miR-153-3p regulates proliferation, invasion and migration of gastric cancer SGC7901 cells via targeting FZD3

ZHANG Cao^a, HE Yaqin^b, QIAN Haiquan^a, YE Jingjing^c (a. Department of Gastrointestinal Surgery; b. Department of Surgery; c. Function Inspection Department of Heart Center, the General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750001, Ningxia, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of miR-153-3p on the proliferation, invasion and migration of gastric cancer SGC7901 cells and its molecular mechanism. **Methods:** A total of 60 pairs of cancer tissues and corresponding para-cancerous tissues of gastric cancer patients who were treated in the General Hospital of Ningxia Medical University during May 2018 and June 2020 were collected for this study; in addition, human gastric cancer cell lines (NCI-N87, AGS, SNU-5, SGC7901) and normal gastric epithelial GES-1 cells were also collected. The expression level of miR-153-3p in gastric cancer tissues and cells was detected by qRT-PCR. miR-153-3p mimics and mimic control were transfected into SGC7901 cells, respectively. The effects of miR-153-3p overexpression on proliferation, apoptosis, invasion and migration of gastric cancer SGC7901 cells were respectively determined using CCK-8, Clone formation assay, Flow cytometry, TUNEL, Transwell and Wound-healing assay. SGC7901 cell transplanted xenograft tumor model in nude mice was established to explore the effect of miR-153-3p on tumor growth. The targeting relationship between miR-153-3p and FZD3 was predicted and verified by bioinformatics database and Dual-luciferase reporter gene assay, respectively. The effects of miR-153-3p on expression of FZD3 protein and Wnt/ β -catenin pathway related proteins were determined by Western blotting. **Results:** The expression level of miR-153-3p in gastric cancer tissues and cells was significantly lower than that in para-cancerous tissues and gastric epithelial cells, with the lowest expression in SGC7901 cells (all $P < 0.01$). Up-regulation of miR-153-3p significantly inhibited the proliferation, invasion and migration abilities of SGC7901 cells, and increased the rate of apoptotic cells (all $P < 0.01$). In addition,

[基金项目] 宁夏自然科学基金资助项目 (No.2019AAC03200, No.2019AAC03225)。Project supported by the Natural Science Foundation of Ningxia (No.2019AAC03200, No.2019AAC03225)

[作者简介] 张曹 (1978—), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究, E-mail: zhangcao_1978@163.com

[通信作者] 何亚琴 (HE Yaqin, corresponding author), 硕士, 助理研究员, 主要从事胃癌和胰腺癌的研究, E-mail: heyq3342@hotmail.com

up-regulation of miR-153-3p significantly promoted the expression of E-cadherin but significantly suppressed the expression of N-cadherin, matrix metalloproteinase-2 (MMP2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP9) (all $P < 0.01$). *In vivo* experiments showed that intravenous injection of miR-153-3p mimics significantly reduced tumor size and Ki-67 expression, but significantly increased the expression of P57 in tumor tissues (all $P < 0.01$). The mechanism analysis showed that miR-153-3p could bind to the 3'UTR region of FZD3 mRNA, and up-regulation of miR-153-3p inhibited the expression of FZD3 and increased the levels of β -catenin, TCF-4 and cyclin D1 (all $P < 0.01$). **Conclusion:** MiR-153-3p regulates the proliferation, invasion and migration of gastric cancer SGC7901 cells via targeting FZD3 gene and regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway.

[Key words] miR-153-3p; FZD3 gene; gastric cancer; SGC7901 cell; proliferation; invasion; migration; Wnt/ β -catenin signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(9): 885-892. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.09.004]

胃癌为常见消化系统恶性肿瘤。据全球癌症统计数据^[1]显示,2018年胃癌全球发病率达到5.7%,病死率高达8.2%,严重影响人的生命健康。胃癌发生和发展与遗传、饮食、幽门螺旋杆菌感染等有关^[1]。然而,目前胃癌发生和发展的分子机制尚未完全明了,因此阐明胃癌发生和发展的分子机制对胃癌的临床治疗、抗癌药物研发等意义重大。微小RNA (microRNA, miRNA) 是长度约19~24 nt的非编码单链RNA。越来越多的研究结果^[2-4]显示,miRNA可与靶基因的3'UTR区通过碱基互补配对的方式进行部分或完全结合,从而抑制转录产物的翻译。miR-153-3p或FZD3基因在卵巢癌、黑色素瘤、骨肉瘤等肿瘤中已被深入报道^[5-7],但胃癌中miR-153-3p与FZD3基因的相互作用及其对胃癌细胞生物学行为影响的研究尚未见报道。本课题通过检测miR-153-3p对胃癌SGC7901细胞增殖、侵袭和迁移的影响,探讨其作用机制,以期阐明胃癌发生和发展的分子机制提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞系及主要试剂

收集2018年5月到2020年6月宁夏医科大学总医院手术切除的60例胃癌患者的癌组织及配对的癌旁组织标本,其中男性36例、女性24例,中位年龄48(35~70)岁;肿瘤分期:I期18例,II期20例,III期19例,IV期3例。病例纳入标准:患者无癌症史;术前无化疗或放疗史。病例排除标准:合并其他胃部疾病的患者;不同意样本采集的患者;信息不全的患者。所有患者术前均告知研究过程并签署知情同意书,研究方案得到所在医院医学伦理委员会的批准。

人胃癌细胞系NCI-N87、AGS、SNU-5、SGC7901和胃上皮细胞GES-1购自美国模式培养物保藏库。

总RNA提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,cDNA逆转录试剂盒购自Thermo Fisher公司,荧光定量PCR(qPCR)试剂盒-SYBR Green I染料购自成都福际生物技术有限公司,各引物均由Prime

Premie5.0设计软件设计并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,miR-153-3p mimic和对照序列(UUUGUACUACACAAAAUACUG)由广州锐博生物公司设计和合成,CCK-8试剂盒、TUNEL细胞凋亡检测试剂盒和BCA蛋白浓度测定试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司,荧光素酶活性检测试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司,E-cadherin、N-cadherin、 β -catenin、Ki-67、P57、FZD3、TCF-1、MMP2、MMP9一抗及HRP标记的羊抗兔二抗等均购自杭州华安生物技术有限公司。

1.2 细胞培养、转染与分组

GES-1、NCI-N87、SGC7901细胞在RPMI 1640培养基中、SNU-5细胞在IMDM培养基中、AGS细胞在F12K培养基中,于37℃、5%CO₂的培养箱中培养。待汇合度达到70%~80%时,用含0.25%胰酶消化后离心(800×g 5 min),制成单细胞悬液后按1:4比例传代。

将对数生长期的SGC7901细胞(3×10^5 个/孔)接种至6孔板中,用无双抗10%血清培养基进行培养,至70%~80%汇合度时进行转染。利用Lipofectamine 2000转染miR-153-3p mimic(4 μ g)的细胞记为转染组或mimic组,转染miR-153-3p mimic对照序列(4 μ g)的细胞记为miR-NC组。培养1~2 d后,收集细胞进行后续检测。

1.3 qPCR法检测胃癌细胞中miR-153-3p及FZD3 mRNA的表达

通过总RNA提取试剂盒从转染后各组SGC7901细胞中提取总RNA,按照逆转录试剂盒提供的标准条件进行逆转录反应,所获取的cDNA用作PCR反应模板,利用qPCR试剂盒-SYBR Green I染料法进行qPCR。PCR反应条件:95℃预变性3 min;95℃变性5 s,56℃退火10 s,72℃延伸25 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法分析目的基因表达。 $\Delta\Delta$ Ct=(处理组Ct_{靶基因}-处理组Ct_{GAPDH或U6})-(阴性对照组Ct_{靶基因}-阴性对照组Ct_{GAPDH或U6})。设阈值2^{- $\Delta\Delta$ Ct}>1.5时表示为高表达。miR-153-3p引物序列:上游为5'-CGCGTTGCA TAGTCACAAAA-3',下游为5'-AGTGCAGGGT

CCGAGGTATT-3'; FZD3 引物序列:上游为 5'-GACTCGGAAATGGGGTCCAA-3',下游为 5'-TCTT CAGTGCCTCAACTTGCT-3'; GAPDH 引物序列:上游为 5'-TGATGACAAGCTTCCCGTTCT-3',下游为 5'-GTGAAGACGGGCGGAGAGAAA-3'; U6 引物序列:上游为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.4 CCK-8 法检测 SGC7901 细胞的增殖能力

收集转染后各组细胞,计数后制成 5×10^4 个/ml 的细胞悬液,接种在 96 孔板中(0.1 ml/孔),分别培养 24、48 h 后,根据 CCK-8 试剂盒说明书要求,每孔中加入 CCK-8 试剂 10 μ l,继续培养 2 h 后,用酶标仪测定波长在 450 nm 处的光密度(D)值,并绘制各组细胞生长曲线。

1.5 克隆形成实验检测 SGC7901 细胞的克隆形成能力

收集各组胃癌 SGC7901 细胞并用血球计数板计数,接着将细胞密度稀释到 3×10^5 个/ml,然后接种至 6 孔板中并使其均匀分散。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱中培养 6 d 后,弃上清并以 PBS 洗剂 2 次,经 4% 多聚甲醛固定 30 min 后,添加 0.1% 结晶紫染色 30 min,洗涤后在显微镜下观察、拍照并计数。

1.6 流式细胞术检测 SGC7901 细胞的凋亡水平

收集各组胃癌 SGC7901 细胞,然后悬于 100 μ l 结合缓冲液中,添加 10 μ l 的 Annexin V-FITC(20 ng/L),轻轻混匀后在 37 $^{\circ}$ C 下避光条件下放置 30 min,随后加入 5 μ l 的 PI(50 ng/L),混匀后在 37 $^{\circ}$ C 下避光条件下放置 5 min,加入 0.4 ml 结合缓冲液后迅速上 FACSCanto II 流式细胞仪检测细胞的凋亡率。

1.7 TUNEL 法检测 SGC7901 细胞的凋亡水平

将各组胃癌 SGC7901 细胞接种至 24 孔板(2×10^5 个/孔)中,经 PBS 洗涤后用 4% 多聚甲醛固定 30 min,后用含 0.3% Triton X-100 的 PBS 处理 5 min 进行通透。随后添加 TUNEL 检测液(50 μ l),在 37 $^{\circ}$ C 下避光孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次后封片,在显微镜下观察 TUNEL 标记的阳性细胞。

1.8 划痕愈合实验检测 SGC7901 细胞的迁移能力

将各组胃癌 SGC7901 细胞接种于 6 孔板中(1×10^6 个/孔)培养,待各组细胞将培养板底部均匀盖满后,用枪头对准孔板保持垂直角度进行细胞划痕,用 maker 笔在 6 孔板背面画横线标记,去除原细胞培养液并进行冲洗,将没有血清的培养基加入,培养板置于细胞培养箱进行培养,按照 0、24 h 的时间点取样、拍照,使用 ImageJ 软件进行统计分析,计算细胞间距离的均值,判断各组细胞的迁移能力。

1.9 Transwell 实验检测 SGC7901 细胞的侵袭能力

将 200 μ l 不含胎牛血清的细胞悬液加入预铺

matrigel 胶的 Transwell 上室,下室内加入 500 μ l 含 10% 胎牛血清的培养基。培养 24 h 后取出 Transwell 小室,用 PBS 洗 2 遍后 4% 多聚甲醛固定 30 min,加入 0.1% 结晶紫溶液染色 10 min,室温下孵育 5 h,显微镜下观察、拍照,随机选取 5 个视野统计穿膜细胞数。

1.10 WB 法检测 SGC7901 细胞中 FZD3、TCF-1、cyclin D1 和 β -catenin 的表达

将各组 SGC7901 细胞置于 RIPA 溶液中,在冰上超声后,10 000 $\times$ g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清,通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。取 20 μ l 总蛋白溶于 SDS 上样缓冲液,煮沸 5 min 后,进行 10% SDS-PAGE,将蛋白质转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h, PBS 洗膜 3 次后分别加入 E-cadherin(1:500)、N-cadherin(1:500)、 β -catenin(1:5 000)、FZD3 兔多抗(1:100)、TCF-1(1:1 000)、cyclin D1(1:5 000)、MMP2(1:1 000)、MMP9(1:100)、GAPDH(1:10 000)等抗体,4 $^{\circ}$ C 下过夜。洗膜 3 次后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:5 000)室温下 1 h。PBS 洗膜 3 次,应用化学发光系统显色并凝胶成像仪显影,用 ImageJ 软件分析蛋白条带的灰度值。

1.11 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-153-3p 与 FZD3 的靶向关系

利用 TargetScan 7.2、miRDB 和 EVmiRNA 数据库对 miR-153-3p 下游靶基因进行预测。构建 FZD3 的 3'UTR 区突变型(MUT)荧光素酶报告基因载体及野生型(WT)荧光素酶报告基因载体,将荧光素酶报告载体与 miR-153-mimic 共转染 SGC7901 细胞 36 h 后收获细胞。按荧光素酶活性检测试剂盒说明书检测 SGC7901 细胞荧光素酶活性。相对荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值。

1.12 裸鼠 SGC7901 细胞移植瘤模型的构建与观察

选择 4~5 周龄的 SPF 级 BALB/c-nu/nu 裸鼠[上海交通大学动物实验中心,生产许可 SCXK(沪)2018-0007],体质量 18~20 g,雌、雄各 50%。将 0.1 ml 密度为 5×10^7 个/ml 的 SGC7901 细胞接种于裸鼠背部皮下,7 d 后测定肿瘤体积,选取肿瘤体积在 80~100 mm³ 的裸鼠进行后续实验。随机将建模成功的裸鼠分为 miR-NC 组和 mimic 组,每组 3 只。荷瘤裸鼠尾静脉分别注射 miR-153 mimic(80 mg/kg,1 次/周)和 miR-NC(80 mg/kg,1 次/周),4 周后断颈处死裸鼠,检测荷瘤鼠的肿瘤体积,肿瘤体积=(肿瘤长直径 $\times$ 肿瘤短直径²)/2。收集肿瘤组织按文献[2-3]方法进行 H-E 染色和免疫组织化学染色检测 Ki-67 和 P57 的表达。

1.13 统计学处理

qPCR、CCK-8、克隆形成、流式细胞术、TUNEL、划痕愈合、Transwell、WB 等实验均重复 3 次。利用

SPSS22.0 统计软件对实验数据进行统计分析, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过 t 检验进行两组间比较, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组中两两比较采用 Dunnett- t 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-153-3p 在胃癌组织和细胞系中低表达

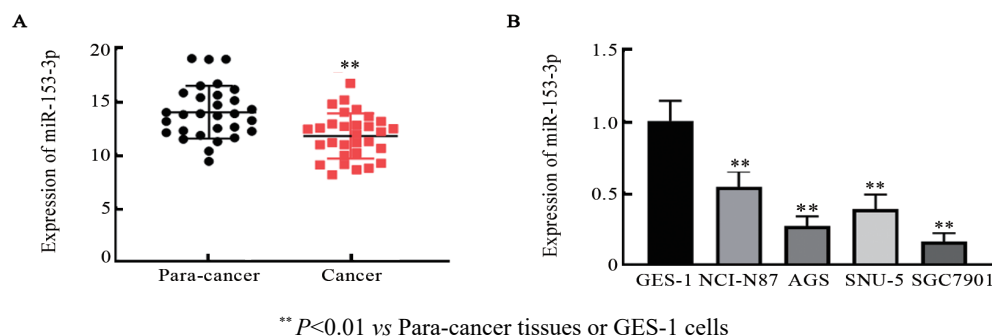


图1 miR-153-3p在胃癌组织(A)和细胞(B)中的表达水平

Fig.1 The expression level of miR-153-3p in gastric cancer tissues (A) and cells (B)

2.2 转染 miR-153-3p mimic 上调 SGC7901 细胞中 miR-153-3p 表达, 抑制细胞增殖、促进凋亡并抑制裸鼠移植瘤的生长

转染 miR-153-3p mimic 后, qPCR 法检测结果(图 2A)显示, 与 miR-NC 组比较, 转染组 SGC7901 细胞中 miR-153-3p 表达水平显著升高 ($t=20.08, P < 0.01$); CCK-8 实验结果(图 2B)显示, 过表达 miR-153-3p 的 SGC-7901 细胞的增殖能力显著下降 (24 h: $t=6.191$;

48 h: $t=6.691$; 均 $P < 0.01$); 细胞克隆实验结果(图 2C)显示, 过表达 miR-153-3p 的 SGC-7901 细胞的克隆形成数目显著减少 ($t=5.256, P < 0.01$); 流式细胞术检测结果(图 2D)表明, 过表达 miR-153-3p 的 SGC-7901 细胞凋亡率显著升高 ($t=6.451, P < 0.01$); TUNEL 实验结果(图 2E)显示, 过表达 miR-153-3p 的 SGC-7901 细胞的凋亡率明显升高 ($t=4.422, P < 0.01$)。

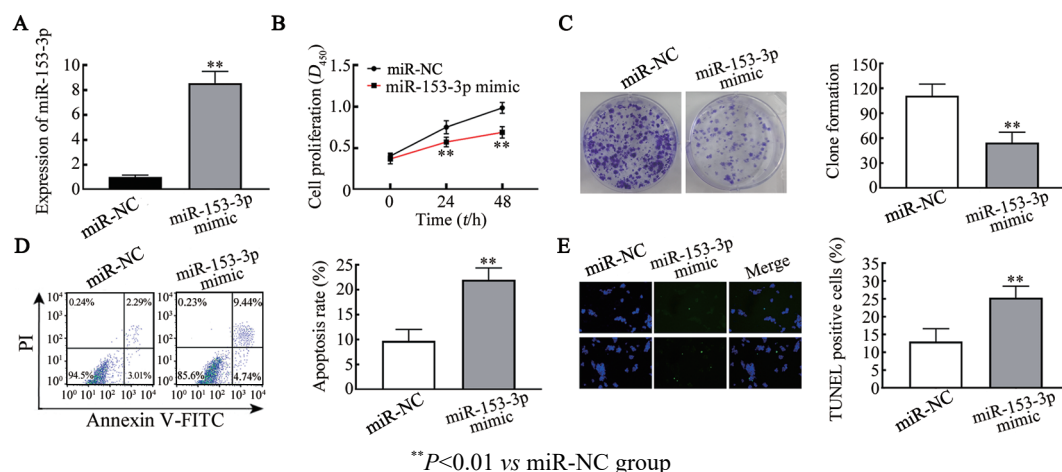


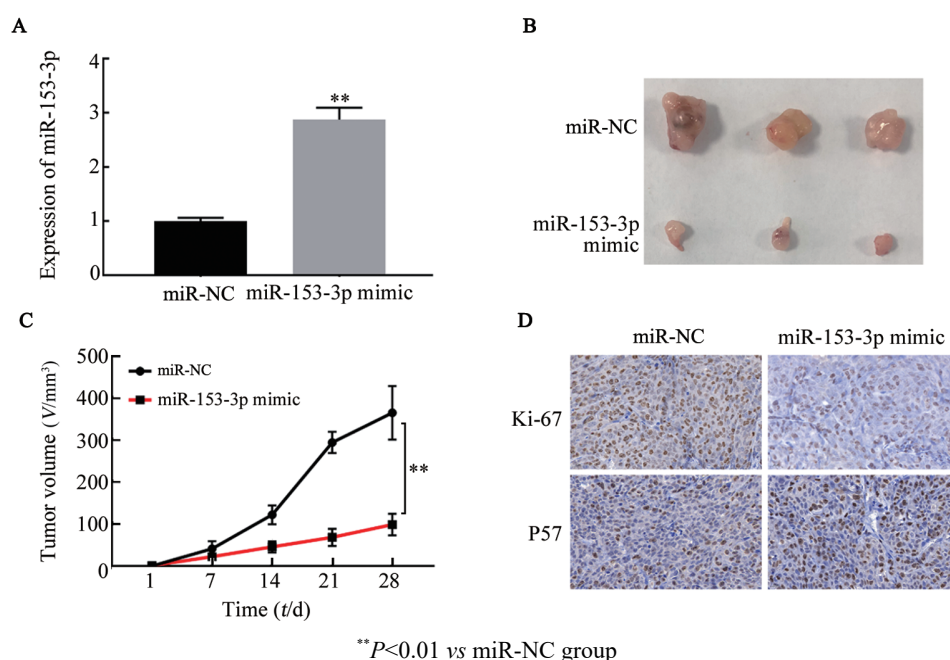
图2 转染 miR-153-3p mimic 对胃癌 SGC7901 细胞中 miR-153-3p 表达(A)、细胞增殖(B)、克隆形成(C)和凋亡(D、E, ×100)的影响
Fig.2 Effects of transfection of miR-153-3p mimics on miR-153-3p expression (A), cell proliferation (B), clone formation (C) and apoptosis (D, E, ×100) in gastric cancer SGC7901 cells

裸鼠 SGC7901 细胞移植瘤模型以 miR-153-3p mimic 治疗后, qPCR 法检测结果(图 3A)显示, 与 miR-NC 治疗组比较, miR-153-3p mimic 组肿瘤组织中 miR-153-3p

表达水平显著升高 ($t=14.37, P < 0.01$); 与 miR-NC 治疗组比较, miR-153-3p mimic 治疗显著降低了移植瘤的体积 ($t=6.151, P < 0.01$; 图 3B、C); 免疫组织化学染色结果

显示,miR-153-3p mimic 治疗显著降低了移植瘤组织中 Ki-67 表达水平 (0.30 ± 0.04 vs 0.72 ± 0.14 , $t=4.847$, $P<0.01$),而显著上调了移植瘤组织中 P57 表达水平 (25.1 ± 1.86 vs 13.24 ± 1.57 , $t=8.437$, $P<0.01$; 图 3D)。

以上实验结果表明,上调 miR-153-3p 可显著抑制 SGC7901 细胞增殖、促进细胞凋亡并抑制裸鼠移植瘤的生长。



A: The expression of miR-153-3p in xenograft tissues was detected by qPCR; B and C: Changes in morphology and volume of the transplanted tumor; D: WB method was used to detect the expression of Ki-67 and P57 in xenograft tissues ($\times 200$)

图3 注射 miR-153-3p mimic 可抑制裸鼠 SGC7901 细胞移植瘤的生长

Fig.3 Injection of miR-153-3p mimics inhibited the growth of SGC7901 cell transplanted tumor in nude mice

2.3 上调 miR-153-3p 抑制胃癌细胞的侵袭和迁移能力

Transwell 实验检测结果 (图 4A) 显示, 上调 miR-153-3p 显著抑制 SGC7901 细胞的侵袭能力 ($t=7.531$, $P<0.01$)。划痕实验检测结果 (图 4B) 表明, 上调 miR-153-3p 显著降低 SGC7901 细胞的迁移能力 ($t=8.926$, $P<0.01$)。WB 实验结果 (图 4C) 发现, 过表

达 miR-153-3p 明显上调 SGC7901 细胞中 E-cadherin 表达 ($t=15.53$, $P<0.01$), 下调 N-cadherin、MMP2 和 MMP9 表达 ($t=10.87$ 、 11.24 、 11.1 , 均 $P<0.01$)。实验结果表明, 上调 miR-153-3p 表达可显著抑制胃癌 SGC7901 细胞的侵袭与迁移能力。

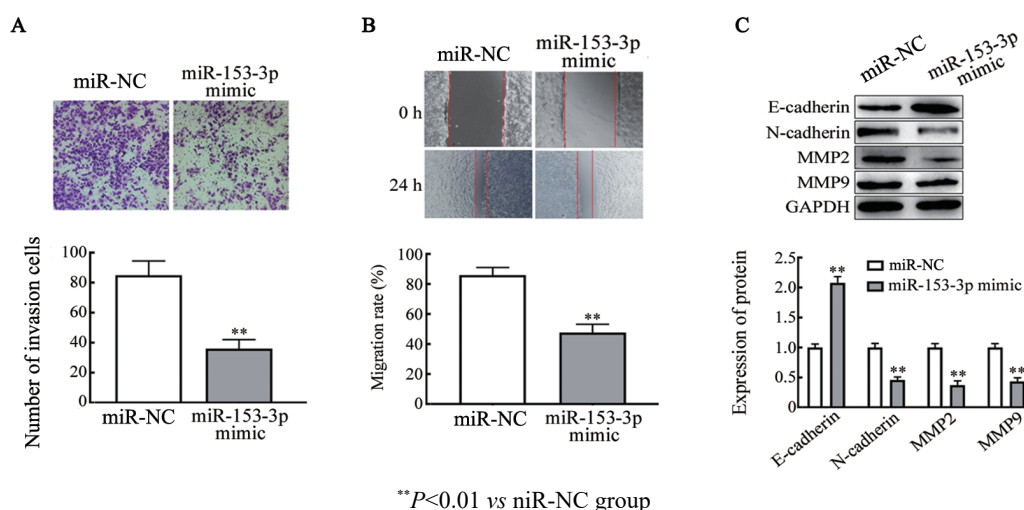


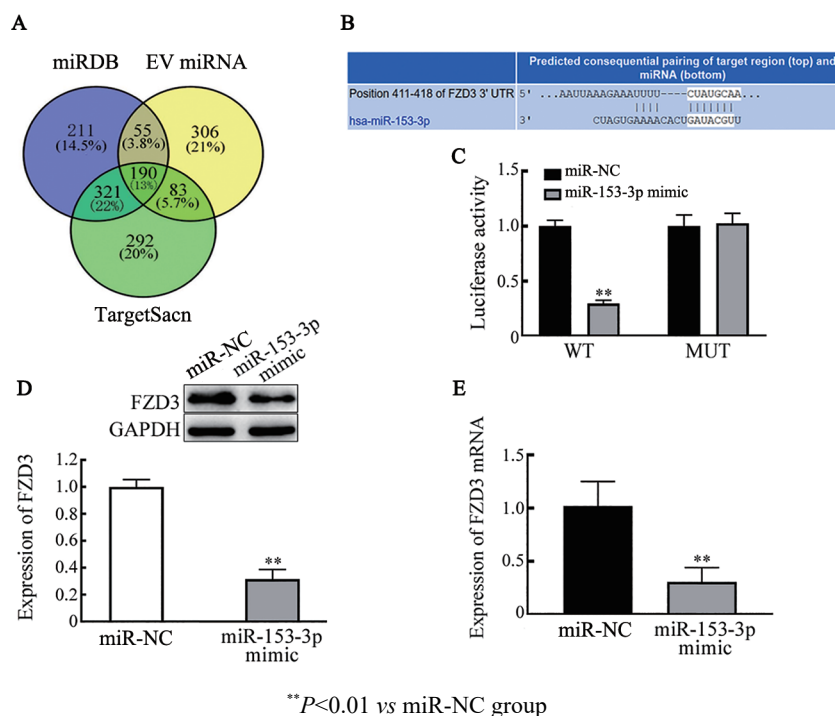
图4 上调 miR-153-3p 对胃癌 SGC7901 细胞侵袭(A, $\times 200$)、迁移(B)和相关蛋白(C)表达的影响

Fig.4 Effect of up-regulating miR-153-3p on invasion (A, $\times 200$), migration (B) and expression of related proteins (C) in gastric cancer SGC7901 cells

2.4 miR-153-3p 能够结合并抑制 FZD3 基因表达

通过 TargetScan 7.2、miRDB 和 EVmiRNA 等数据库预测 miR-153-3p 下游靶点发现, miR-153-3p 存在 190 个下游靶点, 其中 miR-153-3p 和 FZD3 mRNA 的 3'UTR 区域存在结合位点(图 5A、B)。双荧光素酶报告基因实验检测结果(图 5C)发现, 转染 miR-153-3p mimic 后, WT 组细胞的荧光素酶活性显著降低($t=5.842$,

$P<0.01$), 而 MUT 组细胞的荧光素酶活性变化不明显($t=0.531$, $P>0.05$)。检测 miR-153-3p 对 FZD3 表达的影响发现, 上调 miR-153-3p 后, SGC7901 细胞中 FZD3 蛋白水平显著降低($t=13.12$, $P<0.01$; 图 5D); 此外, 上调 miR-153-3p 后, SGC7901 细胞中 FZD3 mRNA 水平显著降低($t=10.01$, $P<0.01$; 图 5E)。



A and B: Predicted binding sites between miR-153-3p and FZD3; C: Dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between of miR-153-3p and FZD3 mRNA; D: WB was used to detect the effect of miR-153-3p on FZD3 protein level; E: qPCR was used to detect the effect of miR-153-3p on FZD3 mRNA level

图5 miR-153-3p 能够结合 FZD3 并抑制其表达
Fig.5 miR-153-3p could bind FZD3 and inhibit its expression

2.5 miR-153-3p 调控 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白的表达

WB 实验结果(图 6)显示, 上调 miR-153-3p 显著抑制 TCF-1 和 cyclin D1 表达水平($t=11.82$ 、 16.35 , 均 $P<0.01$); 同时上调 miR-153-3p 和下调 FZD3 可进一步下调 TCF-1 和 cyclin D1 的表达水平($t=7.566$ 、 6.234 , 均 $P<0.01$; 图 6A); 进一步检测发现, 抑制 miR-153-3p 显著抑制细胞核中 β -catenin 水平($t=12.98$, $P<0.01$), 同时上调 miR-153-3p 和下调 FZD3 可进一步抑制细胞核中 β -catenin 水平($t=9.022$, $P<0.01$; 图 6B)。结果表明, miR-153-3p 能够调控 Wnt/ β -catenin 信号通路。

3 讨论

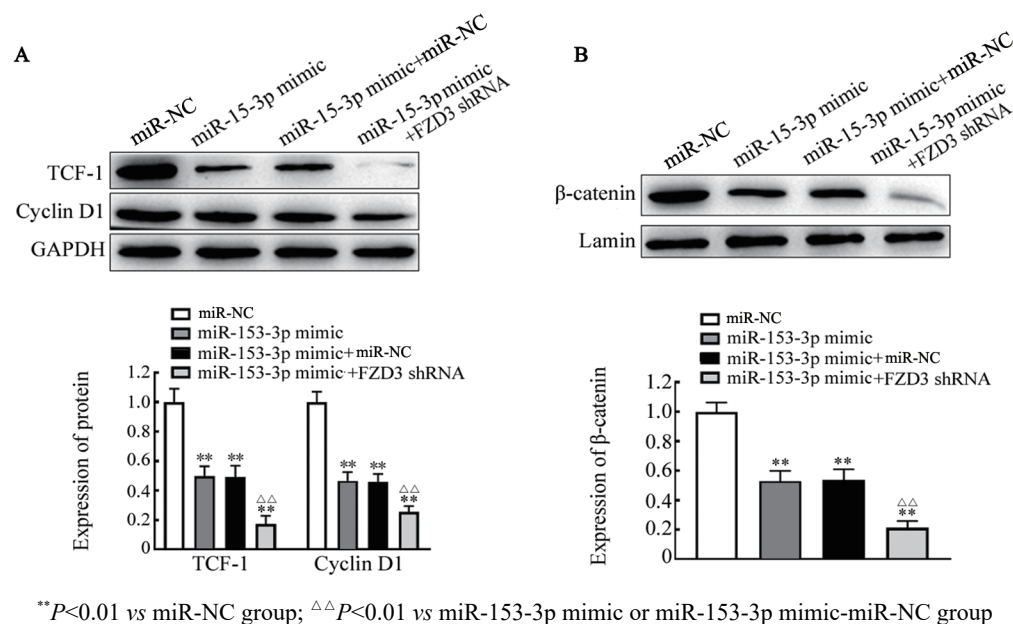
大量研究结果表明, miR-153-3p 参与了肿瘤的发生和发展。如 JIANG 等^[9]的研究显示, miR-153-3p

在急性淋巴细胞白血病中表达水平较低, 同时其能抑制生长蛋白 2 的表达而发挥抑癌作用; SUN 等^[8]研究表明, miR-153-3p 通过靶向 Bcl-2 增强人脑胶质瘤细胞的放疗敏感性。因此, 本研究探究了 miR-153-3p 对胃癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响及其分子机制。

本研究结果发现, miR-153-3p 在胃癌组织与细胞中表达水平分别显著低于癌旁组织与正常胃上皮细胞 GES-1, 与 LIU 等^[9]在食管鳞状细胞癌中的研究结果相近, 表明 miR-153-3p 可能在胃癌中发挥抑癌作用。WANG 等^[10]研究表明, NFATc3 能够激活 miR-153-3p 的转录; ZHANG 等^[11]的研究显示, 与 AGS 细胞和 MGC803 细胞相比, NFATc3 在 SGC7901 细胞中表达水平较低。据此推测, miR-153-3p 在胃癌细胞中表达水平较低可能是由于 NFATc3 水平较低导致的。miR-153-3p 低表达的分子机制后续仍需深入研究。由于 miR-153-3p 在胃癌 SGC7901 细胞中

表达水平最低,因此本研究利用miR-153-3p mimic上调miR-153-3p表达,进而阐明miR-153-3p对SGC7901细胞增殖、侵袭和迁移的调控作用。由于

细胞异质性的原因,miR-153-3p在其他细胞中的作用后续仍需深入研究。



A: The expression of TCF-1 and cyclin D1 was detected by WB; B: The expression of β -catenin was detected by WB

图6 上调miR-153-3P并同时下调FZD3对Wnt/ β -catenin通路相关蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of simultaneously up-regulating of miR-153-3p and down-regulating of FZD3 on the expression of Wnt/ β -catenin pathway related proteins

本研究发现,上调miR-153-3p表达显著抑制了SGC7901细胞的增殖活力并促进细胞凋亡,结果与LUAN等^[12]在黑色素瘤中的研究结果相近,说明上调miR-153-3p有助于抑制胃癌的恶性进展。裸鼠荷瘤实验结果显示,上调miR-153-3p表达明显降低了肿瘤体积,进一步证明了上述发现。越来越多的研究^[13-14]的表明,远处转移是导致胃癌患者死亡的主要原因之一。因此,本研究探究了miR-153-3p对胃癌细胞侵袭和迁移能力的影响。结果表明,上调miR-153-3p表达明显抑制胃癌SGC7901细胞的侵袭和迁移能力,说明miR-153-3p参与了胃癌的侵袭与转移,上调miR-153-3p表达将有助于胃癌的治疗及提高患者的预后。

大量的研究表明,通过碱基互补配对方式,miR-153-3p能够与靶基因的3'UTR区域互补并抑制转录产物的翻译,从而调控靶基因表达。如WANG等^[15]指出,miR-153-3p靶向ATG5 mRNA的3'UTR区域并抑制ATG5的表达;LI等^[16]发现,在系统性红斑狼疮患者中miR-153-3p通过结合PELI1 mRNA的3'UTR区域而抑制PELI1在脐带来源间充质干细胞中的表达。本研究对miR-153-3p下游靶点进行预测发现,miR-153-3p和FZD3 mRNA的3'UTR区域存在结合位点。许多研究^[17-20]显示,FZD3和肿瘤细胞的增殖、转移密切相关。如ZHU等^[20]研究表明,lncRNA SNHG10能够通过调控

FZD3表达而影响Wnt/ β -catenin信号通路,进而促进骨源性肉瘤细胞的增殖与侵袭。因此,本研究对miR-153-3p是否调控FZD3进行了验证。研究结果表明,miR-153-3p能够通过结合3'UTR区域而抑制FZD3 mRNA和FZD3蛋白的表达。Wnt/ β -catenin途径是Wnt信号通路的经典途径。越来越多的研究结果^[21-22]表明,Wnt/ β -catenin途径参与了肿瘤的发生和发展。本研究结果发现,抑制miR-153-3p的同时下调FZD3进一步下调 β -catenin、TCF-1和cyclin D1水平,说明上调miR-153-3p能够抑制Wnt/ β -catenin信号通路。

综上所述,本研究探究了miR-153-3p调控胃癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用及其分子机制。结果显示,miR-153-3p能够通过结合FZD3并调控Wnt/ β -catenin通路进而影响胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移,为阐明胃癌的发生和发展机制提供了新的思路,同时为胃癌预后评估、新药研发提供了新的靶点。

[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] CHENG F H, ZHAO Z S, LIU W D. Long non-coding RNA ROR regulated ABCB1 to induce cisplatin resistance in osteosarcoma by sponging miR-153-3p[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23 (17): 7256-7265. DOI:10.26355/eurrev_201909_18828.
- [3] HU S B, ZHENG Q C, WU H S, et al. miR-532 promoted gastric cancer migration and invasion by targeting NKD1[J]. *Life Sci*, 2017, 177: 15-19. DOI:10.1016/j.lfs.2017.03.019.
- [4] HU X Y, ZHANG M, MIAO J Y, et al. miRNA-4317 suppresses human gastric cancer cell proliferation by targeting ZNF322[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(8): 923-930. DOI:10.1002/cbin.10870.
- [5] JIANG J, LIU Y, ZHAO Y X, et al. miR-153-3p suppresses inhibitor of growth protein 2 expression to function as tumor suppressor in acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. *Technol Cancer Res Treat*, 2019, 18: 1533033819852990[2021-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6542125/>. DOI:10.1177/1533033819852990.
- [6] LI C, ZHANG Y M, ZHAO W, et al. miR-153-3p regulates progression of ovarian carcinoma in vitro and in vivo by targeting MCL1 gene[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(11): 19147-19158. DOI: 10.1002/jcb.29244.
- [7] QI R, WANG D T, XING L F, et al. miRNA-21 promotes gastric cancer growth by adjusting prostaglandin E2[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(7): 1929-1936. DOI: 10.26355/eurrev_201804_14717.
- [8] SUN D Y, MU Y, PIAO H Z. MicroRNA-153-3p enhances cell radiosensitivity by targeting BCL2 in human glioma[J/OL]. *Biol Res*, 2018, 51(1): 56[2021-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6288870/>. DOI:10.1186/s40659-018-0203-6.
- [9] LIU D L, GAO M, WU K, et al. LINC00152 facilitates tumorigenesis in esophageal squamous cell carcinoma via miR-153-3p/FYN axis[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2019, 112: 108654. DOI:10.1016/j.biopha.2019.108654.
- [10] WANG T, ZHAI M, XU S, et al. NFATc3-dependent expression of miR-153-3p promotes mitochondrial fragmentation in cardiac hypertrophy by impairing mitofusin-1 expression[J/OL]. *Theranostics*, 2020, 10(2): 553-566[2021-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6929994/>. DOI:10.7150/thno.37181.
- [11] ZHANG X L, KANG T, ZHANG L, et al. NFATc₃ mediates the sensitivity of gastric cancer cells to arsenic sulfide[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(32): 52735-52745[2021-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5581065/>. DOI: 10.18632/oncotarget.17175.
- [12] LUAN W K, SHI Y, ZHOU Z, et al. circRNA_0084043 promote malignant melanoma progression via miR-153-3p/Snail axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 502(1): 22-29. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.05.114.
- [13] LI F X, SUN Y, HUANG J C, et al. CD4/CD8⁺ T cells, DC subsets, Foxp3, and IDO expression are predictive indicators of gastric cancer prognosis[J/OL]. *Cancer Med*, 2019, 8(17): 7330-7344 [2021-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6885892/>. DOI:10.1002/cam4.2596.
- [14] ZHANG G D, CHI N N, LU Q F, et al. LncRNA PTCSC3 is a biomarker for the treatment and prognosis of gastric cancer[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020, 35(1): 77-81. DOI: 10.1089/cbr.2019.2991.
- [15] WANG X B, WANG H, LONG H Q, et al. LINC00641 regulates autophagy and intervertebral disc degeneration by acting as a competitive endogenous RNA of miR-153-3p under nutrition deprivation stress[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 7115-7127. DOI: 10.1002/jcp.27466.
- [16] LI D, LI X Q, DUAN M Y, et al. MiR-153-3p induces immune dysregulation by inhibiting PELI1 expression in umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Autoimmunity*, 2020, 53(4): 201-209. DOI: 10.1080/08916934.2020.1750011.
- [17] 丁林灿, 郑斐斐, 余林, 等. FZD3 基因在涎腺腺样囊性癌转移与复发中的作用[J]. *福建医科大学学报*, 2013, 47(2): 85-88. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4194.2013.02.006.
- [18] 何婉, 成志强, 黄思铨, 等. FZD3 基因和蛋白在大肠癌中的表达[J]. *贵州医科大学学报*, 2016, 41(6): 681-685. DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.06.014.
- [19] WANG A, WANG Y, ZHAN J, et al. MicroRNA-186-5p inhibits the metastasis of cervical cancer by targeting FZD3[J]. *J BUON*, 2021, 26(3): 677-683.
- [20] ZHU S T, LIU Y, WANG X, et al. LncRNA SNHG10 promotes the proliferation and invasion of osteosarcoma via Wnt/ β -catenin signaling[J/OL]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 957-970[2021-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7674123/>. DOI:10.1016/j.omtn.2020.10.010.
- [21] LI S X, LIU F L, XU L, et al. Wnt/ β -catenin signaling axis is required for TFEB-mediated gastric cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Mol Cancer Res*, 2020, 18 (11): 1650-1659. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-20-0180.
- [22] ZHENG J J, QUE Q Y, XU H T, et al. Hypoxia activates SOX5/wnt/ β -catenin signaling by suppressing miR-338-3p in gastric cancer[J/OL]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 1533033820905825 [2021-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7119234/>. DOI:10.1177/1533033820905825.

[收稿日期] 2021-04-20

[修回日期] 2021-08-26

[本文编辑] 党瑞山