

## 抑制 miR-621 表达促进人胃癌细胞系增殖、迁移和侵袭

陈国雁, 冯晓波\*

(上海中医药大学附属第七人民医院 消化内科, 上海 200137)

**摘要:**目的 检测 miR-621 在胃癌组织及胃癌细胞系中的表达情况, 评估 miR-621 的预后价值, 分析 miR-621 对胃癌细胞生物学功能的影响。方法 荧光定量 PCR 检测癌和癌旁组织以及胃癌细胞系中 miR-621 的表达。用卡方检验分析 miR-621 与胃癌患者临床病理学特征之间的关系; 用生存曲线和 Cox 回归分析 miR-621 对胃癌的预后价值。最后转染胃癌细胞 miR-621 的模拟物和抑制剂, 通过 CCK-8 法、Transwell 小室法分析胃癌细胞增殖、迁移和侵袭能力。结果 胃癌组织以及胃癌细胞系中 miR-621 的表达量显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 且与胃癌患者的淋巴结转移、肿瘤组织分化和 TNM 分期显著相关 ( $P < 0.05$ )。同时发现 miR-621 可以作为胃癌患者的独立预后因子 ( $HR = 3.09$ ,  $95\% CI = 1.31 \sim 7.27$ ,  $P = 0.01$ ), 且 miR-621 表达水平低的患者生存率较差 (log rank test  $P < 0.001$ )。此外, 抑制 miR-621 的表达水平能显著的增加胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭的能力 ( $P < 0.05$ )。结论 miR-621 的低表达与胃癌的不良预后相关, 并且会促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

**关键词:** 胃癌; miR-621; 预后; 生物学功能

中图分类号: R73-3 文献标志码: A

## Inhibition of miR-621 expression promotes proliferation, migration and invasion of human gastric cancer cell lines

CHEN Guo-yan, FENG Xiao-bo\*

(Department of Gastroenterology, the Seventh People's Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200137, China)

**Abstract: Objective** To detect the expression of miR-621 in gastric cancer tissues and cell lines and to evaluate the prognostic significance of miR-621, and to analyze the effect of miR-621 on the biological function of gastric cancer cells. **Methods** Expression of miR-621 in cancer tissue and cell lines was detected by real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). Chi-square test was used to analyze the relationship between miR-621 and clinical pathological features of gastric cancer patients. Prognostic significance of miR-621 for gastric cancer was analyzed by survival curve and Cox regression. Finally, human gastric cancer cells were transfected with miR-621 mimics and inhibitors to analyze the proliferation, migration and invasion ability of gastric cancer cells. **Results** The expression of miR-621 was significantly downregulated in gastric cancer tissues and cell lines as compared to the adjacent tissues and gastric mucosa cell lines ( $P < 0.01$ ), and low expression was associated with lymph node metastasis, tumor differentiation, and TNM stage in gastric cancer ( $P < 0.05$ ). The patients with low expression of miR-621 had a poor overall survival rates (log-rank test  $P < 0.001$ ), and miR-621 was an independent prognostic indicator for gastric cancer patients ( $HR = 3.09$ ,  $95\% CI = 1.31 \sim 7.27$ ,  $P = 0.01$ ). In addition, low-expression of

miR-621 significantly increased proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Low expression of miR-621 is associated with poor prognosis of gastric cancer, which promotes the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells.

**Key words:** gastric cancer; miR-621; prognosis; biological function

胃癌(gastric cancer)是全球第4大常见恶性肿瘤,全世界每年有100多万新发病例,约有78.3万人死亡<sup>[1-2]</sup>。虽然近年来胃癌的治疗和诊断取得了重大的进展,但由于肿瘤易转移,超过70%的患者手术切除后仍会复发,因此早期发现良好的筛查生物标志物是降低胃癌病死率的最佳途径<sup>[3]</sup>。microRNA(miRNA)是一类高度保守的非编码RNA。miRNA在包括胃癌在内的多种恶性疾病中表达异常<sup>[4]</sup>。同时越来越多的研究表明miRNA可作为恶性肿瘤潜在的预后生物标志物和治疗靶点<sup>[5-6]</sup>。在众多miRNAs中,位于染色体13q的miR-621在乳腺癌和肝癌中作用均被发现<sup>[7-8]</sup>。一项研究表明,由于13q缺失导致miR-621下调,诱导周期调控的关键基因上调,导致去分化的肝细胞癌不受控制的增殖<sup>[9]</sup>。同时也有研究表明miR-621可作为乳腺癌预后标志物<sup>[7]</sup>。但目前miR-621在胃癌中的研究及其对临床的意义和生物学功能尚不明确。

本研究通过检测胃癌组织和胃癌细胞中miR-621的表达,评估miR-621对胃癌的预后价值,同时改变miR-621表达量,观察其对胃癌细胞恶性表型的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 患者一般资料:收集2008年8月至2013年8月在上海中医药大学附属第七人民医院治疗的120例胃癌患者的癌及癌旁组织,所有样本均通过2名以上病理学专家明确病理诊断,且临床资料保存完整,无其他恶性肿瘤史,未接受其他手术治疗。按照美国癌联合委员会的第8版TNM分期系统(T是肿瘤范围的大小,N是扩散到附近的淋巴结,M是转移到远端),I-II期患者共48例,III-IV期患者72例。本研究经上海中医药大学附属第七人民医院医院伦理委员会的批准(沪医伦研:2008-057),在患者知情且同意情况下使用临床样本,并对患者进行为期5年手术后随访及记录患者临床病理学资料。

1.1.2 细胞及试剂:人胃黏膜细胞系GES-1和人胃

癌细胞系MKN-45、N87、HGC-27及AGS(美国模式培养物保藏所ATCC);DMEM高糖培养基、胎牛血清、链霉素/青霉素双抗溶液(Gibco公司);细胞培养板及Transwell小室(Corning公司);RNA抽提试剂盒miRNA Purification Kit、反转录试剂盒miRNA cDNA Synthesis Kit及RT-qPCR试剂盒miRNA qPCR Assay Kit(Cwbiotech公司);Trizol试剂、Lipofectamine 2000转染试剂(Invitrogen公司);转染载体miR-621 mimic、miR-621 inhibitor、mimic NC、inhibitor NC(RiboBio公司);CCK-8细胞活力检测试剂盒(MedChemExpress公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞的培养与分组处理:均用含10%胎牛血清(FBS)和含1%青/链霉素的高糖DMEM培养基培养细胞。待细胞至对数增殖期进行细胞转染实验。转染试剂为Lipofectamine 2000,将细胞分为对照组(control);mimic control组:转染mimic control;miR-621 mimic组:转染miR-621过表达试剂miR-621 mimic;inhibitor control组:转染inhibitor control;miR-621 inhibitor组:转染miR-621抑制试剂miR-621 inhibitor。转染6h后进行换液,继续培养。

1.2.2 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测mRNA:用Trizol分别提取癌和癌旁组织及转染后细胞总RNA,并将其反转成cDNA,然后根据SYBR Premix Ex Taq™试剂盒说明书进行RT-qPCR检测组织和细胞中miR-621的表达量。RT-qPCR检测时以U6作为内参进行,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对miR-621的相对表达量进行计算。

1.2.3 CCK-8法检测细胞增殖:将转染后处于对数期的细胞以每孔1000个/孔细胞接种于96孔板中,每隔24h进行检测,检测前向孔中添加10  $\mu$ L CCK-8试剂,培养箱中孵育2h后,检测490nm处吸光度值,连续检测3d,评估miR-621对胃癌细胞增殖能力的影响。

1.2.4 Transwell小室法检测细胞迁移和侵袭:在含有基质胶的Transwell上室中添加50  $\mu$ L培养液放置培

养箱中水化基膜 30 min,取 200  $\mu\text{L}$  含  $3 \times 10^4$  个细胞的悬液添加至 Transwell 的上室,下室添加 500  $\mu\text{L}$  含 10% FBS 的培养基。过夜培养后,将上室细胞及基质胶擦拭掉,4%多聚甲醛固定 10 min,0.1%结晶紫染色 20 min,双蒸水清洗后,显微镜下随机选取 5 个视野拍照并计数,检测细胞侵袭能力变化。迁移能力检测时,直接在上室中添加细胞即可,其他操作与侵袭相同。

### 1.3 统计学分析

计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。研究中采用 *t* 检验进行组间差异比较,卡方检验分析 miR-621 表达量与患者临床病理特征之间的关系,多因素 Cox 回归分析评估 miR-621 在胃癌的预后价值,Kaplan-Meier 法和 log-rank 检验对患者的生存率进行分析。使用 SPSS19.0 和 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据分析和处理。

## 2 结果

### 2.1 miR-621 在胃癌组织和细胞中的表达水平

在胃癌组织中 miR-621 表达水平显著低于癌旁组织(图 1A) ( $P < 0.01$ )。此外,miR-621 在胃癌细胞系中的表达水平明显低于正常胃黏膜细胞(图 1B) ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 miR-621 表达量与癌患者临床病理特征之间的关系

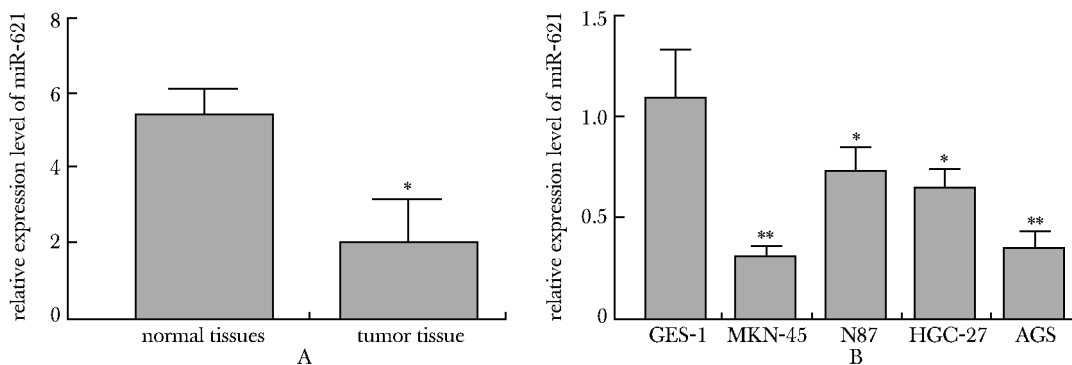
miR-621 的表达与胃癌患者的临床 TNM 分期

( $P < 0.01$ )、肿瘤分化程度( $P < 0.05$ )及淋巴结转移( $P < 0.05$ )存在显著相关性(表 1),并且表现为 miR-621 表达水平较低时,胃癌患者的肿瘤分化程度较低、TNM 分期为 III-IV、有淋巴结转移能力。

表 1 miR-621 表达量与胃癌患者临床病理特征的关系  
Table 1 Relationship between miR-621 expression and clinicopathological features of gastric cancer patients

clinicopathological feature	case number ( <i>n</i> = 120)	miR-621 expression	
		low ( <i>n</i> = 63)	high ( <i>n</i> = 57)
age/year			
<50	56	30	26
$\geq 50$	64	33	31
tumor size/cm			
$\leq 5$	61	31	30
>5	59	32	27
TNM staging **			
I - II	48	18	30
III - IV	72	45	27
differentiation *			
high-middle	51	21	30
poor	69	42	27
lymph node metastasis *			
negative	50	20	30
positive	70	43	27

TNM. classification adapted from American Joint Committee on Cancer (AJCC); T. primary tumor; N. regional lymph nodes; M. distant metastasis; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with low group.



A. expression of miR-621 in normal tissues and cancer tissues was detected by RT-qPCR; \* $P < 0.05$  compared with normal tissues; B. expression level of miR-621 in normal gastric mucosa cells GES-1 and gastric cancer cell lines was detected by RT-qPCR; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with GES-1 group

图 1 miR-621 在胃癌组织和细胞系中的相对表达量

Fig 1 Relative expression of miR-621 in gastric cancer tissues and cell lines ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 3)

## 2.3 miR-621 在癌患者中的预后作用

对胃癌患者进行为期 5 年术后随访,患者总体中位生存期为 42 个月,miR-621 低表达患者的中位生存期为 36 个月。miR-621 低表达的患者生存率显著低于 miR-621 高表达的患者(log rank test  $P < 0.001$ )。进一步探讨 miR-621 与其临床病理学特征对患者生存率的影响,对胃癌患者临床数据进行分析,miR-621 是胃癌的独立预后因子(表 2) ( $P < 0.01$ )。

表 2 胃癌患者总体生存率的多因素 Cox 回归分析  
Table 2 Multivariate Cox regression analysis for the overall survival of gastric cancer patients ( $\bar{x} \pm s, n = 120$ )

characteristic	multivariate analysis	
	HR	95% CI
miR-621	3.09	1.31-7.27*
age	0.62	0.26-1.46
tumor size	0.96	0.39-2.34
differentiation	1.41	0.69-2.91
TNM stage	2.07	0.85-5.07
lymph node metastasis	3.12	1.27-7.68*

TNM classification adapted from American Joint Committee on Cancer (AJCC); T. primary tumor; N. regional lymph nodes; M. distant metastasis; \* $P < 0.05$ .

## 2.4 miR-621 对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

miR-621 模拟物组表达量显著高于对照组 ( $P < 0.001$ ),而抑制剂组 miR-621 的表达量显著低于对照组 ( $P < 0.001$ )。结果证明胃癌细胞的转染效率较高(图 2A)。miR-621 模拟物组的增殖能力显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ),而 miR-621 抑制组的增殖能力较对照组显著增高(图 2B) ( $P < 0.05$ )。miR-621 抑制剂的迁移和侵袭细胞数显著高于对照组 ( $P < 0.001$ ),而 miR-621 模拟物组的迁移和侵袭细胞数显著低于对照组(图 2C,D) ( $P < 0.001$ )。

## 3 讨论

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤,外科手术是目前唯一根治的方法,随着手术、传统放化疗及新辅助治疗技术的不断提高和改善,早期胃癌 5 年生存

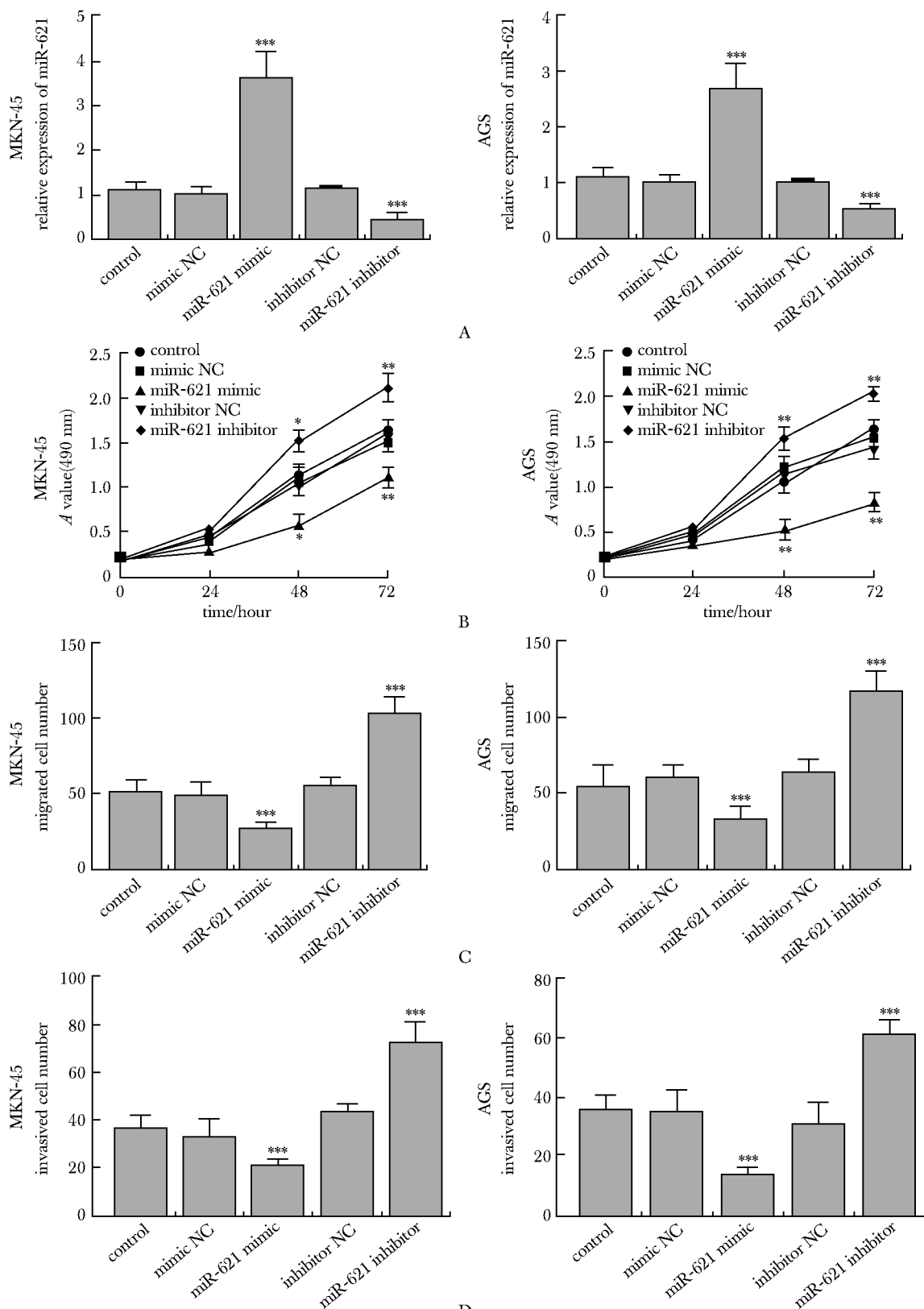
率高达 95%。然而,早期诊断率较低,多数胃癌患者诊断时已处于晚期,错过最佳手术时机,而晚期胃癌中因存在转移风险,所以胃癌患者总体预后较差<sup>[10]</sup>。因此寻找治疗的预测标志物和潜在治疗靶点对胃癌患者是必要的。

既往的研究已证实 miRNA 可作为癌基因或抑癌基因参与肿瘤发生与进展。而最近的研究发现异常表达的 miRNA 可以作为肿瘤诊断和预后标志物。例如 miR-503 可通过靶向 HMGA2 抑制 WNT 信号通路抑制胃癌细胞的增殖和侵袭,是胃癌的预后标志物<sup>[11]</sup>。而 miR-621 已被报道为某些肿瘤抑癌因子参与肿瘤发生发展以及预后。如 miR-621 通过抑制 FBXO11 对 p53 的依赖性能增强乳腺癌细胞对 PTX/CBP 化疗的敏感性,是乳腺癌治疗的预测标志物和潜在治疗靶点<sup>[7]</sup>。下调 miR-621 可通过靶向 CAPRN1 促进肝癌细胞的增殖<sup>[8]</sup>。

本研究检测患者癌及癌旁组织,发现 miR-621 在胃癌的表达量显著低于癌旁,且癌细胞的表达量也显著低于胃黏膜细胞。分析临床病理特征,发现 miR-621 表达水平较低的患者,其淋巴结转移能力强、肿瘤分化程度低且 TNM 分期为 III-IV。说明 miR-621 可能是胃癌的潜在抑癌基因。对 miR-621 的临床意义进一步探讨,生存曲线和 Cox 回归分析证明,miR-621 低表达的患者 5 年生存率较差,且是胃癌独立预后因子。这与 miR-621 在乳腺癌和肝癌的研究类似,证明 miR-621 具有作为胃癌预后标志物的潜能。

进一步研究 miR-621 对胃癌细胞生物学功能的影响。通过研究发现,抑制 miR-621 表达可显著促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。研究表明 miR-621 作为抑癌基因参与胃癌的进展,是潜在的疾病治疗靶点,但 miR-621 在胃癌中的分子机制尚不明确,需进一步探究。

综上所述,本研究证明 miR-621 在胃癌组织和细胞中的表达显著下降,并与胃癌的不良预后相关。同时抑制 miR-621 的表达会显著促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭。因此 miR-621 可以作为胃癌的一个预后标志物,且上调 miR-621 的表达将有望成为胃癌治疗的新策略。



A. expression of miR-621 after cell transfection; B. changes in cell proliferation capacity were detected by CCK-8 assay; C. number of cell migration was detected by Transwell assay; D. number of cell invasion was detected by Transwell assay; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with control group

图2 miR-621对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

Fig 2 Effects of miR-621 expression on breast cancer cell proliferation, migration and invasion ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

## 参考文献:

- [1] Ding L, Zhao Y, Dang S, *et al.* Circular RNA circ-DONSON facilitates gastric cancer growth and invasion via NURF complex dependent activation of transcription factor SOX4[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18: 45. doi: 10.1186/S12943-019-1006-2.
- [2] 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: 394-424.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67: 7-30.
- [4] Hu X, Zhang M, Miao J, *et al.* miRNA-4317 suppresses human gastric cancer cell proliferation by targeting ZNF322[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42: 923-930.
- [5] Link A, Kupcinskas J. MicroRNAs as non-invasive diagnostic biomarkers for gastric cancer: Current insights and future perspectives[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24: 3313-3329.
- [6] Zhang C, Bo C, Guo L, *et al.* BCL2 and hsa-miR-181a-5p are potential biomarkers associated with papillary thyroid cancer based on bioinformatics analysis[J]. *World J Surg Oncol*, 2019, 17: 221. doi:10.1186/S12957-019-1755-9.
- [7] Xue J, Chi Y, Chen Y, *et al.* MiRNA-621 sensitizes breast cancer to chemotherapy by suppressing FBXO11 and enhancing p53 activity[J]. *Oncogene*, 2016, 35: 448-458.
- [8] Zhang Y, You W, Zhou H, *et al.* Downregulated miR-621 promotes cell proliferation via targeting CAPRIN1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8: 2116-2129.
- [9] Skawran B, Steinemann D, Becker T, *et al.* Loss of 13q is associated with genes involved in cell cycle and proliferation in dedifferentiated hepatocellular carcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2008, 21: 1479-1489.
- [10] Song Z, Wu Y, Yang J, *et al.* Progress in the treatment of advanced gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39. doi:10.1177/1010428317714626.
- [11] Li W, Li J, Mu H, *et al.* miR-503 suppresses cell proliferation and invasion of gastric cancer by targeting HMGA2 and inactivating WNT signaling pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 164. doi:10.1186/S12935-019-0875-1.

## 新闻点击

## 孕妇 2019 冠状病毒病 (COVID-19) 可能没有症状

据《新英格兰医学杂志》(*The New England Journal of Medicine, NEJM*)报道,对2020年3月下旬和4月初在纽约市两家医院分娩的孕妇进行的一项研究发现,约有1/7的人感染了新型冠状病毒(SARS-CoV-2),但大多数未显示症状。

所有患者入院后均接受了SARS-CoV-2检测,其中33例检测出SARS-CoV-2感染呈阳性。Irving医学中心的Dena Goffman博士领导的研究小组说,如果不对这些妇女进行检查,那么大多数那些潜在有害或可传播的病例都将被错过。

实际上,“33例阳性患者中有29例(87.9%)在入院时呈阳性……在就诊时未出现COVID-19症状,”Goffman和她的同事指出。33例患者中只有4例表现出典型的COVID-19症状,例如发烧。

至少在短期内,许多女性也没有继续出现症状。在这29例无症状产科患者中,只有3例在住院的几天内继续发烧,甚至不清楚发烧是否与COVID-19或其他疾病有关。

据撰写该报告的纽约市医生说,最重要的是,应对所有入院接受产科护理的妇女进行SARS-CoV-2检测。

刘晓菡 译

王欣 编