

消化系统疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002110

长链非编码 RNA-MALAT1 调控 miR-22/snail 轴对胃癌增殖、迁移及侵袭的影响

陈虹宇, 廖盛涛, 郑 茜, 邱烈旺, 余柯岐, 吕 琳, 梅浙川

(重庆医科大学附属第二医院消化内科, 重庆 400010)

【摘要】目的:探讨长链非编码 RNA MALAT1(long non-coding RNA MALAT1, lnc RNA MALAT1)调控 miR-22/snail 轴对胃癌增殖、迁移及侵袭的影响。**方法:**采用 siRNA 干扰技术抑制 MALAT1 表达,同时过表达 miR-22 和 Snail;采用 RT-PCR 检测 MALAT1, miR-22 和 snail 在胃癌细胞系中的表达水平($n=3$);采用 Western blot 检测 NC 组、si-MALAT1 组中 snail 蛋白的表达水平($n=3$);采用 CCK-8 法在 12、24、48、72 h 检测 NC 组、si-MALAT1 组、miR-22 组、miR-22+snail 组、si-MALAT1+miR-22 组中细胞吸光度值($n=3$);采用划痕实验检测 NC 组、si-MALAT1 组、miR-22 组迁移速度($n=3$);采用 Transwell 检测 NC 组、si-MALAT1 组、miR-22 组、miR-22+snail 组、si-MALAT1+miR-22 组穿过膜细胞的个数($n=3$);采用双荧光素酶检测 NC+pMIR-MALAT1-WT 组、NC+pMIR-MALAT1-MUT 组、miR-22+pMIR-MALAT1-WT 组、miR-22+pMIR-MALAT1-MUT、NC+pMIR-Snail-WT 组、NC+pMIR-Snail-MUT 组、miR-22+pMIR-Snail-WT 组、miR-22+pMIR-Snail-MUT 组的荧光活性($n=3$)。两独立样本间的比较采用 t 检验,多组数据之间的比较采用单因素方差进行分析,涉及时间因素时采用重复测量方差分析。**结果:** MALAT1 在胃癌细胞系中的表达水平明显高于正常胃黏膜上皮细胞(均 $P=0.000$);低表达 MALAT1 后,AGS 和 SGC-7901 增殖能力($P_1=0.001, P_2=0.005$),迁移能力($P_1=0.018, P_2=0.007$),侵袭能力($P_1=0.024, P_2=0.015$)均降低;同时双荧光素酶结果显示 MALAT1 能够靶向结合 miR-22($P=0.001$),miR-22 能够靶向结合 snail($P=0.001$);miR-22 在胃癌细胞系中的表达水平明显低于正常胃黏膜上皮细胞(均 $P<0.05$);过表达 miR-22 后,AGS 和 SGC-7901 增殖能力($P_1=0.004, P_2=0.009$),迁移能力($P_1=0.034, P_2=0.005$),侵袭能力($P_1=0.037, P_2=0.011$)均降低;在低表达 MALAT1 和过表达 miR-22 后能够更进一步增加低表达 MALAT1 后对 AGS 和 SGC-7901 的增殖($P_1=0.022, P_2=0.006$)和侵袭($P_1=0.024, P_2=0.015$)的抑制作用;同时过表达 miR-22 和 snail 后能够反转 miR-22 对 AGS 和 SGC-7901 的增殖($P_1=0.003, P_2=0.004$)和侵袭($P_1=0.015, P_2=0.01$)的抑制作用。**结论:** MALAT1 在胃癌细胞中明显高表达,并能通过调控 miR-22/snail 轴促进胃癌增殖、迁移及侵袭。

【关键词】长链非编码 RNA MALAT1; miR-22; snail; 增殖; 迁移; 侵袭**【中图分类号】**R735.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-12-19

Effects of long non-coding RNA MALAT1 on the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer through regulating the miR-22/snail axis

Chen Hongyu, Liao Shengtao, Zheng Qian, Qiu Liwang, Yu Keqi, Lü Lin, Mei Zhechuan

(Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of long non-coding RNA MALAT1 on the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer through regulating the miR-22/snail axis. **Methods:** The expression of MALAT1 was inhibited by siRNA technology, and miR-22 and snail were overexpressed; real-time PCR was used to determine the expression levels of MALAT1, miR-22, and snail in gastric cancer cell lines($n=3$); Western blot was used to determine the expression level of snail protein in NC group and si-MALAT1 group($n=3$); CCK8 assay was used to determine the cell absorbance values in NC group, si-MALAT1 group, miR-22 group, miR-22+snail group, and si-MALAT1+miR-22 group at 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h($n=3$); wound healing assay was used to determine the migration rate in NC group, si-MALAT1 group, and miR-22 group($n=3$); transwell assay was used to determine the number of transmembrane cells in NC group, si-MALAT1 group, miR-22 group, miR-22+snail group, and si-MALAT1+miR-22 group($n=3$); dual luciferase assay was used to determine the fluorescence activity in NC+pMIR-MALAT1-WT group, NC+pMIR-MALAT1-MUT group, miR-22+pMIR-MALAT1-WT group, miR-22+pMIR-MALAT1-MUT group, NC+pMIR-Snail-WT group, NC+pMIR-Snail-MUT group, miR-22+pMIR-Snail-WT group, and miR-22+pMIR-Snail-MUT group($n=3$). The t -test was used for comparison between

作者介绍: 陈虹宇, Email: 371336762@qq.com,

研究方向: 消化系统肿瘤的研究。

通信作者: 梅浙川, Email: zhechuanmei@126.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190507.1737.015.html>

(2019-05-08)

two independent samples; one-way analysis of variance was used for comparison between multiple sets of data, and repeated measures analysis of variance was used for time-associated factors. **Results:** The expression level of MALAT1 in gastric cancer cell lines was significantly higher than that in normal gastric

mucosal epithelial cells(all $P=0.000$);after underexpression of MALAT1,AGS and SGC-7901 had significantly decreased proliferative ability,migration ability,and invasion ability($P_1=0.001,0.018$,and 0.024 ,respectively; $P_2=0.005,0.007$,and 0.015 ,respectively);meanwhile,the dual luciferase assay results showed that MALAT1 could targetedly bind to miR-22,and miR-22 could targetedly bind to snail(both $P=0.001$). The expression level of miR-22 in gastric cancer cells was significantly lower than that in normal gastric mucosal epithelial cells($P<0.05$);after overexpression of miR-22,AGS and SGC-7901 had significantly decreased proliferative ability,migration ability,and invasive ability($P_1=0.004,0.034$,and 0.037 ,respectively; $P_2=0.009,0.005$,and 0.011 ,respectively). Concomitant underexpression of MALAT1 and overexpression of miR-22 could further enhance the inhibitory effect on the proliferation and invasion of AGS and SGC-7901 after underexpression of MALAT1($P_1=0.022$ and 0.024 ,respectively; $P_2=0.006$ and 0.015 ,respectively);concomitant overexpression of miR-22 and snail could reverse the inhibitory effect of miR-22 on the proliferation and invasion of AGS and SGC-7901($P_1=0.003$,and 0.015 ,respectively; $P_2=0.004$ and 0.01 ,respectively). **Conclusion:** There is significantly overexpressed MALAT1 in gastric cancer cells,which can facilitate the proliferation,migration,and invasion of gastric cancer by regulating the miR-22/snail axis.

[Key words] long non-coding RNA MALAT1;miR-22;snail;proliferation;migration;invasion

胃癌是全球第三大死亡原因,中国占有所有新诊断和死亡病例的 40%以上^[1]。由于胃癌早期症状不典型,绝大多数患者已处于诊断的中晚期。通过多年研究,在胃癌的诊断和治疗方面取得了重大进展,但胃癌的五年生存率仍然很低^[2]。因此,只有通过通过对胃癌病因和发病机制系统深入研究,才能为胃癌患者提供新的诊断方式和治疗策略。

随着基因组测序技术的发展,越来越多的非编码 RNA(non-coding RNA,ncRNA)功能被识别出来,其表达水平反映了肿瘤的本质特征。因此,ncRNA 在探索肿瘤发生机制和生物标志物方面具有重要价值^[3]。对人类基因组测序结果的分析显示,能够编码整个基因组蛋白质的 DNA 只占一小部分,其中大部分是不编码蛋白质的 DNA。这些 DNA 转录产物是 ncRNA^[4]。长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)已逐渐成为研究的新热点。它在调节细胞分化、增殖、转移等方面发挥着重要作用,并能与微小 RNA(microRNA,miRNA)相互作用^[5]。其中,miRNA 相关肿瘤研究已成为 ncRNA 肿瘤研究的前沿,并取得了许多突破^[6]。许多 lncRNA 的结构类似于 mRNA,因此 miRNA 可以通过类似于 mRNA 的机制负调控 lncRNA。此外,miRNA 也可以通过表观遗传调控积极调控 lncRNA^[7]。研究表明,消化系统恶性肿瘤存在异常表达的 miRNA 和 lncRNA,他们发挥着促癌或抑癌作用,与消化系统肿瘤的复发、转移及预后密切相关^[8-9]。本研究通过探索 MALAT1 影响胃癌细胞生长、增殖、迁移及侵袭等生物学行为的功能发挥,并用数据库预测 MALAT1 的靶基因 miR-22,以及 miR-22 的靶蛋白 snail。重点研究探讨 MALAT1-miR-22-Snail 轴在调控胃癌细胞增殖、侵袭和迁移方面的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人胃黏膜细胞 GES-1 与胃癌细胞株(AGS、SUN-16、MKN-45、SGC-7901)购于中科院上海细胞库;DMEM/F12 高糖培养液和胎牛血清分别购自美国 Gibco 公司和美国 HyClone 公司。Transwell(侵袭实验)用小室和 Matrigel 胶购自美国康宁公司;RIPA 裂解液和 ECL 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;山羊抗兔 IgG(辣根过氧化物酶标记)购自美国 Cell Signaling Technology 公司。CCK-8 试剂盒和重组慢病毒、空载体病毒、荧光素酶、嘌呤霉素耐药基因分别购于日本同仁化学研究所和上海吉凯基因化学技术有限公司。PCR 引物由生物工程(上海)有限公司合成,TRIzol、逆转录试剂盒、Real-time 荧光定量 PCR 试剂均购自日本 Takara 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和转染 所有实验用细胞株均常规培养于含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液(含 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素)中,培养箱条件为 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂。转染方法按说明书进行。

1.2.2 qRT-PCR TRIzol 法提取细胞总 RNA 并按说明书提供的方法反转录为 cDNA。该 cDNA 作为实时荧光定量 PCR 的模板,检测 MALAT1、miR-22 和 Snail mRNA 的表达。参考序列(U6,si-MALAT1,Snail)由 GenePharma(中国上海)合成。U6:上游引物序列为:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-TT-3',下游引物序列为:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3';MALAT1:上游引物序列为:5'-CACAGGGAAAGCGAGU-GGUUGGUAATT-3',下游引物序列为 5'-UUACCAACCAC-UCGCUUCCUGUGTT-3';Snail:上游引物序列为:5'-CC-CACUCAGAUGUCAAGAATT-3',下游引物序列为:5'-UUC-UUGACAUCUGAGUGGGTT-3'。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C 5 s,39 个循环,75 $^{\circ}$ C 7 min。目的基因及内参照基因的 Ct 值用 CFX96 Real-time System 软件分析,目的基因 mRNA 的相对表达水平以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算。

1.2.3 Transwell 体外侵袭试验 Transwell 侵袭小室由 Ma-

trigel生物胶覆盖底部并分为上下2层,将无血清的DMEM/F12培养液培养的细胞接种于小室上层,去血清培养12 h,然后将含10%的胎牛血清DMEM/F12培养液加入下室。培养24 h后,将小室取出、固定清洗后在显微镜下(100倍)取任意5个视野细胞数的平均数计数,以其作为细胞的侵袭数。

1.2.4 CCK-8法 将细胞制备成单细胞悬液接种到96孔板中,在培养箱中培养12、24、48、72 h后,向每孔加入CCK-8工作液,培养4 h后检测各孔的光密度(optical density, OD)值。

1.2.5 细胞划痕实验 将用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基将细胞接种于6孔板中,待细胞贴壁并长至80%~90%融合时划线,PBS洗后换成无血清的DMEM/F12培养基,显微镜下拍照,记录0 h的细胞状态后继续培养,并于48 h后再次拍照。每组设3个副孔取均值。

1.2.6 Western blot测定蛋白表达水平 采用RIPA蛋白裂解液和PMSF蛋白酶抑制剂提总蛋白,用BCA法测定蛋白质浓度。取20 μ g总蛋白上样量上样,在聚偏二氟乙烯膜上转移电泳分离后的蛋白,10%封闭液封闭1 h,加入特异性的一抗在4 $^{\circ}$ C条件下反应过夜,洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(二抗)37 $^{\circ}$ C反应1 h;洗膜后ECL曝光成像并应用Quantity One软件分析蛋白条带的灰度值。

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测 将海肾荧光素酶载体共转染于HEK293T中,采用Dual Luciferase Reporter Assay system检测萤火虫荧光和海肾荧光,通过海肾荧光为内参,对每组相对荧光素酶活性比进行统计学分析。每组实验重复3次,取平均值进行后统计分析。

1.3 统计学处理

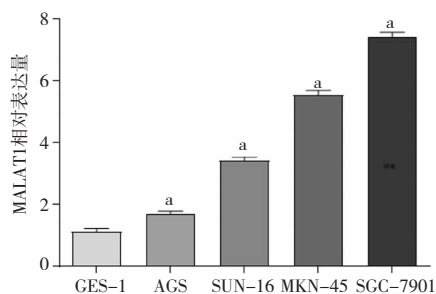
所有实验均独立重复3次。应用SPSS 17.0软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两独立样本

间的比较采用 t 检验;多组数据之间的比较采用单因素方差进行分析;涉及时间因素时采用重复测量方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

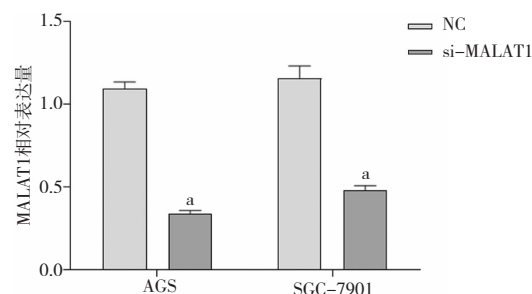
2 结果

2.1 MALAT1在胃癌细胞中表达量及对胃癌细胞增殖的影响

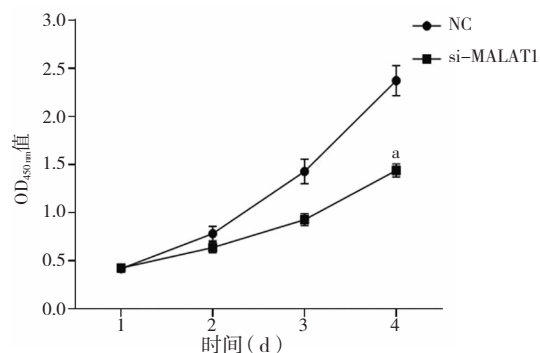
qRT-PCR结果(图1A)显示,5种细胞系的MALAT1表达量均有差异($F=453.641, P=0.000$),与人胃黏膜上皮细胞(GES-1)表达量(1.111 ± 0.178)相比,MALAT1在4种胃癌细胞(AGS, SUN-16, MKN-45, SGC-7901)中的相对表达量($1.701 \pm 0.127, 3.418 \pm 0.209, 5.544 \pm 0.255, 7.411 \pm 0.272$)明显增高,差异均具有统计学意义(均 $P=0.000$)。如图1B qRT-PCR定量结果显示,与未转染组相比,siRNA干扰后明显降低MALAT1在AGS、SGC-7901细胞中的表达水平[(1.097 ± 0.038) vs. (0.341 ± 0.016); (1.159 ± 0.072) vs. (0.480 ± 0.029)],差异具有统计学意义($t=18.040, P=0.000; t=8.737, P=0.001$)。采用CCK-8法评价siRNA干扰MALAT1后对胃癌细胞增殖的影响,在细胞AGS中(图1C),随着siRNA干扰细胞的时间延长,处理组与对照组的增殖能力均增强($F_{交互}=41.224, P_{交互}=0.000$),且siRNA干扰MALAT1的Day4在细胞AGS中对照组的表达量为 2.372 ± 0.155 ,处理组的表达量为 1.437 ± 0.067 ,细胞增殖能力明显减弱($F_{组别}=97.121, P_{组别}=0.001$);在细胞SGC-7901中(图1D),随着siRNA干扰细胞的时间延长,处理组与对照组的增殖能力均增强($F_{交互}=75.683, P_{交互}=0.000$),且siRNA干扰MALAT1的第4天在细胞SGC-7901中对照组的表达量为 2.533 ± 0.175 ,处理组的表达量为 1.543 ± 0.111 。细胞的增殖能力也明显减弱($F_{组别}=32.708, P_{组别}=0.005$)。



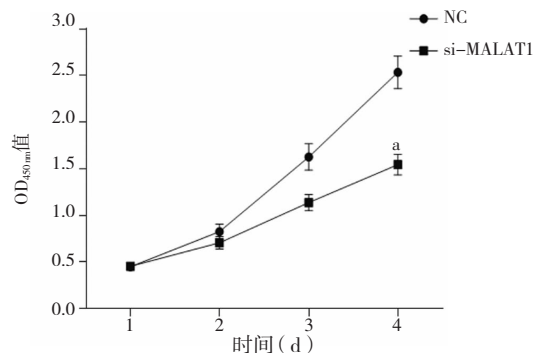
A. PCR法检测胃黏膜细胞与胃癌细胞中MALAT1的表达量



B. PCR法验证siRNA转染后MALAT1在AGS、SGC-7901的表达量



C. CCK-8法检测siRNA转染后AGS的增殖情况



D. CCK-8法检测siRNA转染后SGC-7901的增殖情况

注:a,与对照组相比, $P < 0.05$

图1 MALAT1在胃癌细胞中表达量及对胃癌细胞增殖的影响

2.2 低表达 MALAT1 后对胃癌细胞迁移和侵袭的影响

采用划痕实验测定 siRNA 干扰 MALAT1 后细胞 AGS、SGC-7901 迁移率的变化。结果显示,对照组划痕后 48 h,转染组细胞迁移速度明显降低 $[(8.333 \pm 0.882) \text{ vs. } (4.667 \pm 0.333); (11.330 \pm 0.882) \text{ vs. } (6.000 \pm 0.577)]$,差异有统计学意义($t=3.889, P=0.018; t=5.060, P=0.007$),如图 2A、C 所示。采用 Transwell 法检测细胞侵袭能力,发现与对照组相比,siRNA 干扰 MALAT1 后,转染组 AGS $[(76.670 \pm 8.819) \text{ vs. } (41.670 \pm 4.410)]$ 、SGC-7901 $[(113.300 \pm 12.020) \text{ vs. } (55.000 \pm 7.638)]$ 穿过小室膜细胞数量降低,差异有统计学意义($t=3.550, P=0.024; t=4.096, P=0.015$),如图 2B、D 所示。

2.3 双荧光素酶验证 MALAT1 与 miR-22 靶向结合

如图 3A 所示, MALAT1 与 miR-22 存在结合位点,同时采用双荧光素酶报告进一步验证其靶向结合。如图 3B 所示,在 pMIR-MALAT1-WT 组中荧光素酶相对活性明显降低 $[(1.103 \pm 0.065) \text{ vs. } (0.530 \pm 0.025)]$,差异有统计学意义($t=8.228, P=0.001$)。在 pMIR-MALAT1-MUT 组中荧光素酶相对活性较空白对照组未见明显降低,差异无统计学意义。如图 3C 所示,同时在过表达 miR-22 后, MALAT1 在 AGS $[(1.097 \pm 0.039) \text{ vs. } (0.422 \pm 0.035)]$ 和 SGC-7901 $[(1.159 \pm 0.072) \text{ vs. } (0.506 \pm 0.023)]$ 细胞中表达水平明显降低,差异有统计学意义($t=13.020, P=0.000; t=8.608, P=0.001$)。图 3D qRT-PCR 所示,在 siRNA 干扰 MALAT1 后的细胞 AGS、SGC-7901 中

miR-22 的表达量比对照组高 $[(1.479 \pm 0.085) \text{ vs. } (1.006 \pm 0.053), (1.533 \pm 0.033) \text{ vs. } (1.021 \pm 0.077)]$,差异有统计学意义($t=4.700, P=0.009; t=6.051, P=0.003$)。图 3E qRT-PCR 所示,在 siRNA 干扰 MALAT1 后的细胞 AGS、SGC-7901 中 Snail 的表达量比对照组低 $[(0.459 \pm 0.092) \text{ vs. } (1.010 \pm 0.049), (0.542 \pm 0.040) \text{ vs. } (1.037 \pm 0.065)]$,差异有统计学意义($t=5.286, P=0.006; t=6.465, P=0.002$)。图 3F、G, Western blot 检测同样证明在 siRNA 干扰 MALAT1 后的细胞 AGS、SGC-7901 中 Snail 的表达量比对照组低 $[(0.513 \pm 0.057) \text{ vs. } (0.987 \pm 0.055), (0.596 \pm 0.047) \text{ vs. } (1.062 \pm 0.055)]$,差异有统计学意义($t=5.956, P=0.004; t=6.422, P=0.003$)。

2.4 miR-22 在胃癌细胞中表达量及对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

如图 4A qRT-PCR 结果所示,5 种细胞系中的 miR-22 的表达量均有差异($F=62.773, P=0.000$),与正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 (0.979 ± 0.0554) 相比较,miR-22 在胃癌细胞系 AGS、SUN-16、MKN-45 和 SGC-7901 中的表达量 $(0.626 \pm 0.099, 0.482 \pm 0.046, 0.373 \pm 0.054, 0.255 \pm 0.0282)$ 明显降低。差异均具有统计学意义($P=0.000, P=0.001, P=0.040, P=0.040$)。qRT-PCR 定量结果显示(图 4B),与 AGS、SGC-7901 空白对照组 $(1.084 \pm 0.054, 0.963 \pm 0.051)$ 相比,转染 miR-22 mimics 后 AGS、SGC-7901 细胞中的 miR-22 的表达水平增高 $(3.885 \pm 0.159, 3.264 \pm 0.174)$,差异有统计学意义($t=$

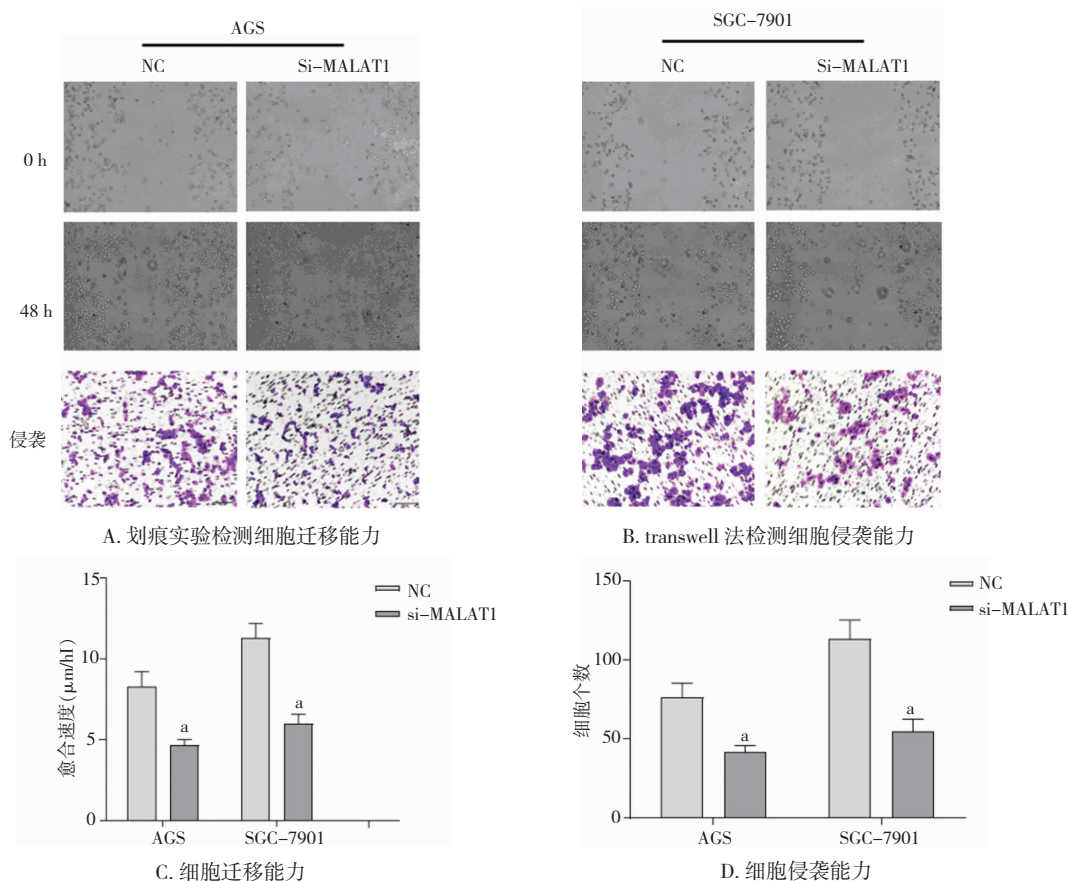
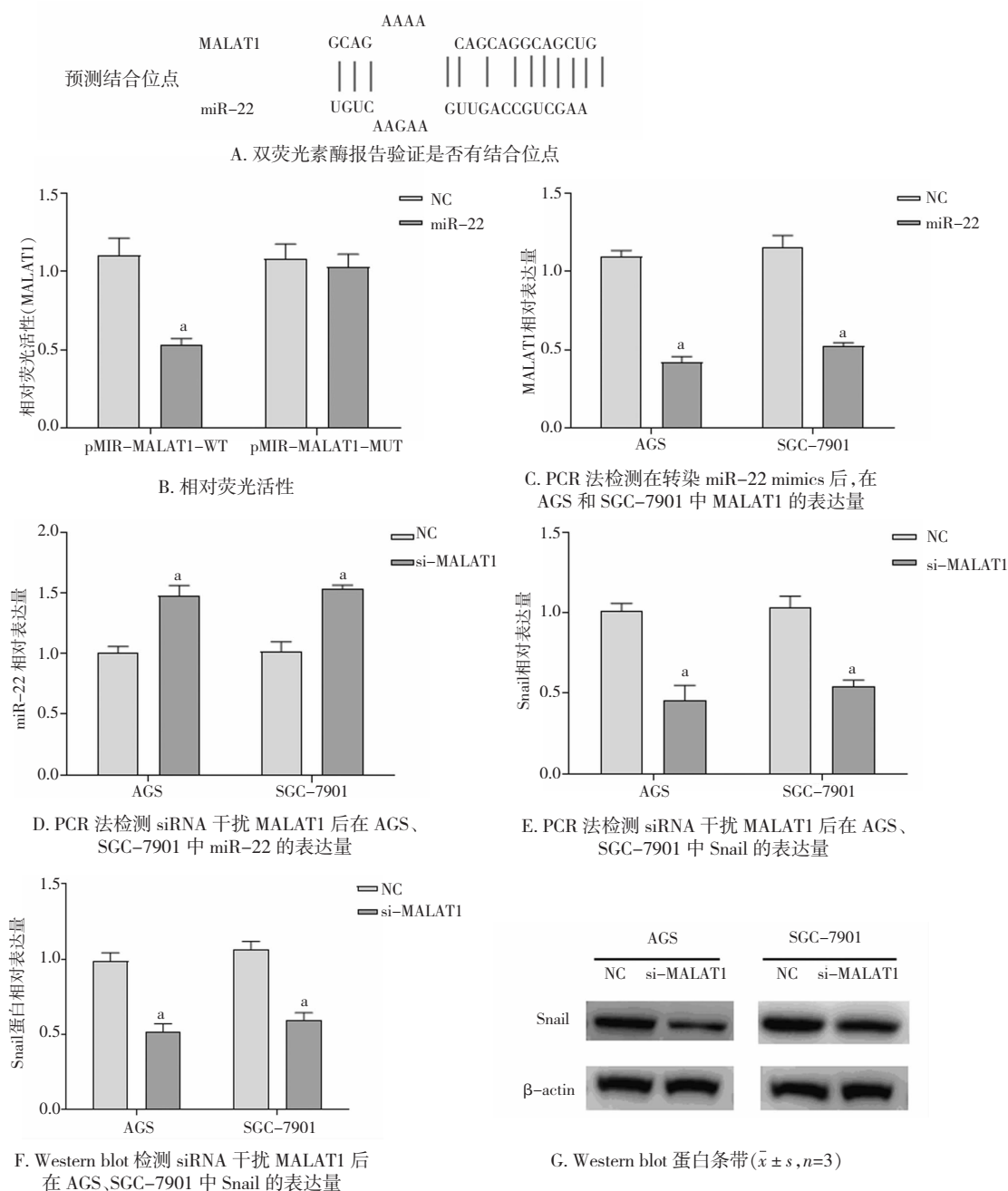


图 2 低表达 MALAT1 后对胃癌细胞迁移和侵袭的影响

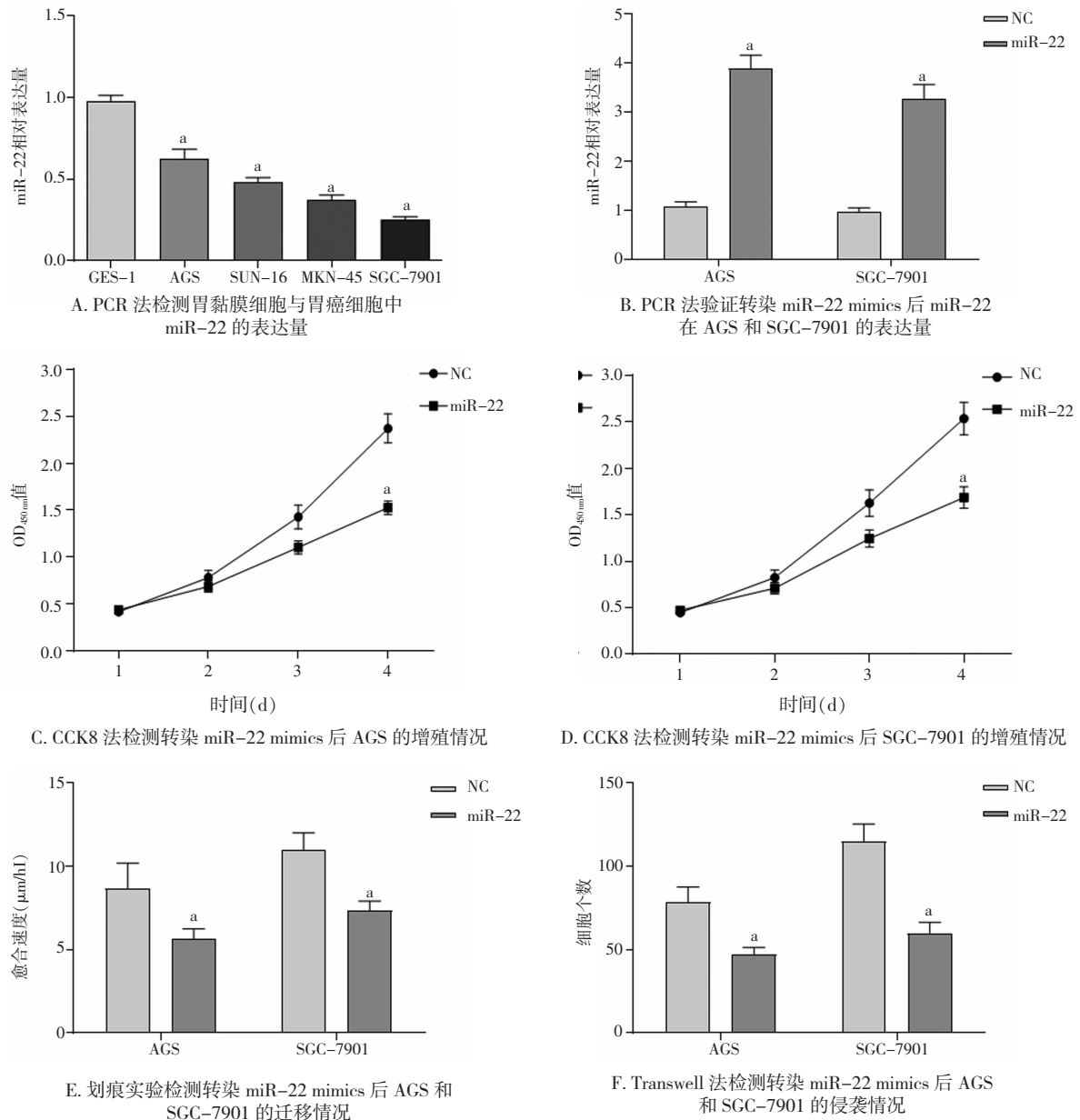
16.730, $P=0.000$; $t=12.660$, $P=0.000$)。采用 CCK-8 法评价转染 miR-22 mimics 后对胃癌细胞增殖的影响,在细胞 AGS (图 4C)中,随着转染 miR-22 mimics 的时间延长,处理组与对照组的增殖能力均增强 ($F_{交互}=48.421$, $P=0.000$),且转染 miR-22 mimics 的第 4 天在细胞 AGS 中对照组的表达量为 2.372 ± 0.155 ,处理组的表达量为 1.526 ± 0.074 ,细胞增殖能力明显减弱 ($F_{分组}=35.743$, $P=0.004$);在细胞 SGC-7901 (图 4D)中,随着转染 miR-22 mimics 的时间延长,处理组与对照组的增殖能力均增强 ($F_{交互}=51.267$, $P=0.002$),且转染 miR-22 mimics 的第 4 天在细胞 SGC-7901 中对照组的表达量为 2.533 ± 0.175 ,处理组的表达量为 1.684 ± 0.116 。细胞的

增殖能力也明显减弱 ($F_{分组}=22.620$, $P=0.009$)。为评价转染 miR-22 mimics 后对 AGS、SGC-7901 两种细胞迁移、侵袭的影响。如图 4E 采用划痕实验测定转染 miR-22 mimics 后细胞 AGS、SGC-7901 迁移数的变化。结果显示,转染组细胞迁移数明显降低 [(8.667 ± 0.882) vs. (5.667 ± 0.333) , (11.000 ± 0.577) vs. (7.333 ± 0.333)], 差异有统计学意义 ($t=3.182$, $P=0.034$; $t=5.500$, $P=0.005$)。如图 4F 采用 Transwell 法检测细胞侵袭能力,结果发现,转染 miR-22 mimics 后 AGS、SGC-7901 细胞侵袭数量降低 [(78.330 ± 9.280) vs. (47.330 ± 3.930) , (115.000 ± 10.410) vs. (59.670 ± 6.766)], 差异有统计学意义 ($t=3.076$, $P=0.037$; $t=4.457$, $P=0.011$)。



注:a,与对照组相比, $P < 0.05$

图 3 双荧光素酶检测 MALAT1 与 miR-22 的靶向结合



注:a,与对照组相比, $P < 0.05$

图4 miR-22 在胃癌细胞中表达量及对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

2.5 双荧光素酶验证 miR-22 与 snail 靶向结合

如图 5A 所示,miR-22 与 snail 存在结合位点,同时采用双荧光素酶报告进一步验证其靶向结合。如图 5B 所示,在 pMIR-Snail-WT 组中荧光素酶相对活性明显降低 $[(1.126 \pm 0.063) \text{ vs. } (0.547 \pm 0.028)]$,差异有统计学意义($t=8.443, P=0.001$)。在 pMIR-Snail-MUT 组中荧光素酶相对活性较空白对照组未见明显降低。同时如图 5C 所示,PCR 法检测在转染 miR-22 mimics 后,与对照组相比,AGS 和 SGC-7901 细胞中 Snail 的 mRNA 表达水平明显降低 $[(3.268 \pm 0.131) \text{ vs. } (1.079 \pm 0.05), (3.644 \pm 0.149) \text{ vs. } (1.207 \pm 0.056)]$,差异有统计学意义($t=15.65, P=0.000; t=15.34, P=0.000$)。如图 5D、E 所示,Western blot 检测转染 miR-22 mimics 后,与对照组 AGS、SGC-7901 ($1.784 \pm 0.097, 2.075 \pm 0.112$)相比,AGS 和 SGC-

7901 细胞中 Snail 的蛋白表达水平明显降低($0.938 \pm 0.042, 1.284 \pm 0.054$),差异有统计学意义($t=8.023, P=0.001; t=6.366, P=0.003$)。

2.6 低表达 MALAT1 和过表达 miR-22 以及同时过表达 miR-22 和 Snail 对胃癌细胞增殖和侵袭的影响

CCK-8 结果(图 6A、B)显示,3 种不同的处理方式对 AGS 和 SGC7901 的增殖均有影响($F=43.865, P=0.000; F=37.004, P=0.000$)。随着时间延长,细胞的增殖能力均增强($F_{交互}=87.178, P_{交互}=0.001; F_{交互}=76.097, P_{交互}=0.001$),且在第 4 天,同时转染 miR-22 mimics 和 Snail 的 AGS、SGC-7901 表达量为 $2.468 \pm 0.160, 2.704 \pm 0.168$,单转染 miR-22 mimics 的 AGS、SGC-7901 的表达量为 $1.526 \pm 0.074, 1.684 \pm 0.116$,说明同时转染 miR-22 mimics 和 Snail 的细胞增殖能力明显

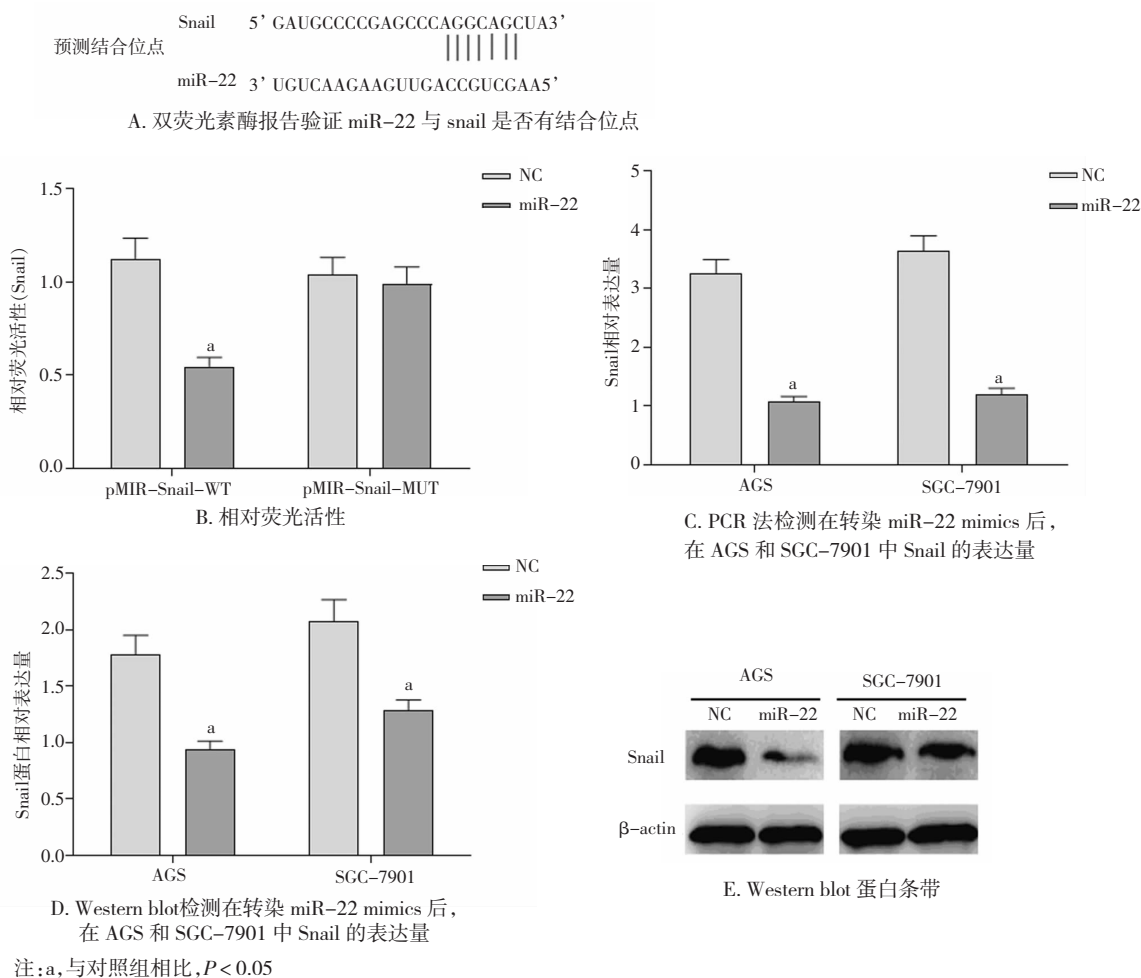


图5 miR-22 双荧光素酶报告基因实验

增加($F_{\text{组别}}=42.990$, $P_{\text{组别}}=0.003$; $F_{\text{组别}}=36.672$, $P_{\text{组别}}=0.004$)。CCK-8 结果(图 6C、D)所示,3 种不同的处理方式对 AGS 和 SGC7901 的增殖均有影响($F=97.436$, $P=0.000$; $F=118.339$, $P=0.000$),随着时间延长,细胞的增殖能力均增强($F_{\text{交互}}=27.387$, $P_{\text{交互}}=0.006$; $F_{\text{交互}}=63.053$, $P_{\text{交互}}=0.001$),且在第 4 天,同时转染 MALAT1siRNA 和 miR-22 mimics 后 AGS、SGC-7901 的表达量为 1.010 ± 0.127 , 0.927 ± 0.083 ,单转染 MALAT1siRNA 的表达量为 1.437 ± 0.067 , 1.543 ± 0.111 ,说明同时转染 MALAT1siRNA 和 miR-22 mimics 的细胞增殖能力减弱($F_{\text{组别}}=13.186$, $P_{\text{组别}}=0.022$; $F_{\text{组别}}=81.910$, $P_{\text{组别}}=0.006$)。Transwell 法检测细胞侵袭能力(图 6E),3 种因素对 AGS 和 SGC-7901 细胞侵袭均有影响($F=6.892$, $P=0.028$; $F=12.021$, $P=0.008$),且在细胞 AGS 和 SGC-7901 中单转染 miR-22 mimics 的侵袭能力(47.330 ± 3.930 , 59.670 ± 6.766)比同时转染 miR-22 mimics、snail 的侵袭能力弱(82.000 ± 7.506 , 119.300 ± 11.050),差异有统计学意义($t=4.092$, $P=0.015$; $t=4.605$, $P=0.010$)。如图 6F 所示,Transwell 法检测细胞侵袭能力,3 种因素对细胞侵袭均有影响($F=14.357$, $P=0.005$; $F=21.344$, $P=0.002$),且发现在细胞 AGS 和 SGC-7901 中同时转染 MALAT1siRNA 和 miR-22 mimics 后细胞侵袭能力(31.670 ± 4.410 , 40.670 ± 2.333)比单转染 MALAT1 siRNA (41.670 ± 4.410 , 55.000 ± 7.638)降低,差异均有统计学意义($t=3.550$, $P=0.024$; $t=4.096$, $P=0.015$)。

3 讨论

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,发病率与死亡率都非常高,尽管治疗手段不断发展,但患者预后仍较差^[10]。MALAT1 与多种肿瘤的发生发展密切相关,在肝癌、膀胱癌、结直肠癌中均有研究^[11-14],表明 MALAT1 可作为癌基因在上述肿瘤中起重要作用。而本实验着重研究 MALAT1 对胃癌的影响: MALAT1 在胃癌细胞系中的高表达提示 MALAT1 可能在胃癌中起到促癌作用。实验显示,干扰 MALAT1 后,胃癌细胞 AGS 和 SGC-7901 的增殖及侵袭迁移明显下降,进一步证实 MALAT1 参与调控胃癌细胞的增殖及侵袭性迁移,是一种促癌基因。

miRNA 为短链非编码 RNA,通过与靶基因特定区域的结合可以降解靶基因,从而使靶基因的表达降低,实现转录后调控作用^[15]。通过这种调控作用 miRNA 可与靶基因形成复杂的调控网络,从而影响细胞生长的调节^[16]。先前的研究表明,miR-22 表达

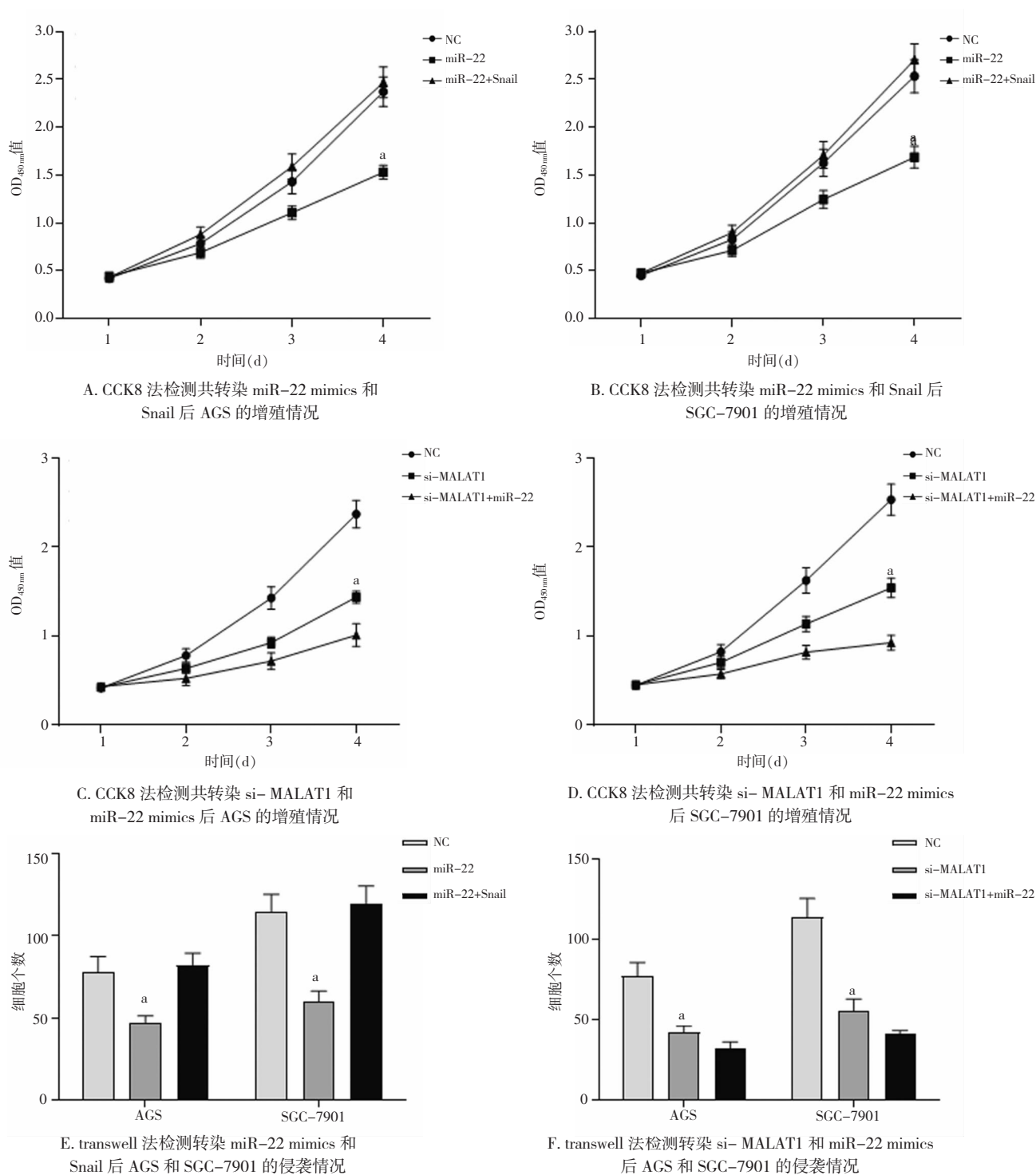


图 6 低表达 MALAT1 和过表达 miR-22 以及同时过表达 miR-22 和 Snail 对胃癌细胞增殖和侵袭的影响

的失调是多种癌症的标志并且可以在许多细胞的生理过程中发挥作用^[7]。虽然 miR-22 在胃癌病理发生中的相关研究已有文献报道^[18-19],但 miR-22 在胃癌中的确切表达及作用机制尚不清楚。本实验主要研究过表达 miR-22 后对胃癌细胞增殖和侵袭迁移的影响。实时荧光定量 PCR 的结果发现,miR-22

在不同类型的胃癌细胞中均呈现一定程度的低表达,这与以前的研究结果一致。随后,本实验通过体外细胞实验进一步探讨了 miR-22 对胃癌细胞 AGS、SGC-7901 的影响。结果显示,转染 miR-22 mimics 之后,胃癌细胞 AGS、SGC-7901 的增殖侵袭及迁移能力明显受到抑制。

Snail 是 EMT 转变过程中最重要的调控因子,在表皮间质转化过程中 E-cadherin 的表达能够被抑制^[20],它能在肿瘤的发生发展中起关键调节作用^[21]。早期研究报道,snail 高表达与胃癌患者淋巴结转移相关^[22],同时 snail 可以作为胃癌患者生存率和预后的独立预测因子^[23]。在本实验中,通过生物信息学预测和转录芯片联合筛选及双荧光素酶报告基因实验,验证了 miR-22 与靶蛋白 snail 存在结合位点。并且本研究还发现低表达 MALAT1 和过表达 miR-22 后能够更进一步增加低表达 MALAT1 后对胃癌细胞增殖和侵袭的抑制作用;同时过表达 miR-22 和 snail 后能够反转 miR-22 对胃癌细胞增殖和侵袭的抑制作用。

由于本研究是在体外细胞系中的研究,尚存在一定的不足,比如上调 MALAT1,或者下调 miR-22 的表达对胃癌细胞系的影响如何,在动物体内的结果如何均有待进一步研究明确。

综上所述,MALAT1 在胃癌细胞中高表达,且干扰 MALAT1 可抑制胃癌细胞 AGS 和 SGC-7901 增殖和侵袭迁移;miR-22 在胃癌细胞 AGS 和 SGC-7901 中低表达且转染 miR-22 mimics 后胃癌细胞 AGS 和 SGC-7901 的增殖及侵袭迁移能力明显受抑制;同时双荧光素酶报告验证 MALAT1 与 miR-22 存在结合位点,且 snail 为 miR-22 的靶基因,在低表达 MALAT1 和过表达 miR-22 后能够更进一步增加低表达 MALAT1 后对胃癌细胞增殖和侵袭的抑制作用;同时过表达 miR-22 和 snail 后能够反转 miR-22 对胃癌细胞增殖和侵袭的抑制作用。这提示 MALAT1 能通过调控 miR-22/snail 轴促进胃癌增殖、迁移及侵袭。本课题对胃癌细胞增殖、侵袭和迁移的研究可能为今后开发新的肿瘤治疗药物提供依据。

参 考 文 献

- [1] Shao Y, Li J, Lu R, et al. Global circular RNA expression profile of human gastric cancer and its clinical significance[J]. *Cancer Medicine*, 2017, 6(6): 1173–1180.
- [2] Network TCGA. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma[J]. *Nature*, 2014, 513(7517): 202–209.
- [3] Yaghoobi M, Bijarchi R, Narod SA. Family history and the risk of gastric cancer[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(2): 237–242.
- [4] Anastasiadou E, Jacob LS, Slack FJ, et al. Non-coding RNA networks in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(1): 5–18.
- [5] Zhu M, Chen Q, Liu X, et al. lncRNA H19/miR-675 axis represses prostate cancer metastasis by targeting TGFBI[J]. *FEBS Journal*, 2014, 281(16): 3766–3775.
- [6] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834–838.
- [7] Ye S, Yang L, Zhao X, et al. Bioinformatics method to predict two regulation mechanism: TF-miRNA-mRNA and lncRNA-miRNA-mRNA in pancreatic cancer[J]. *Cell Biochemistry & Biophysics*, 2014, 70(3): 1849–1858.
- [8] Iorio MV, Croce CM. microRNA involvement in human cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(6): 1126–1133.
- [9] Berindan-Neagoe I, Monroig Pdel C, Pasculli B, et al. MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy[J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(5): 311–336.
- [10] Cronin KA, Lake AJ, Scott S, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: national cancer statistics[J]. *Cancer*, 2018, 124(13): 2785–2800.
- [11] Yang L, Bai HS, Deng Y, et al. High MALAT1 expression predicts a poor prognosis of cervical cancer and promotes cancer cell growth and invasion[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(17): 3187–3193.
- [12] Han S, Zhongmin LI, Han B, et al. Expression of long non-coding RNA MALAT1 in hepatocellular carcinoma tissue and its actions on proliferation and invasion/metastasis of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2018, 27(1): 49–54.
- [13] Liang Y, Qi C, Wang Y, et al. Upregulated MALAT-1 contributes to bladder cancer cell migration by inducing epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Molecular Biosystems*, 2012, 8(9): 2289–2294.
- [14] Xu C, Yang M, Tian J, et al. MALAT-1: a long non-coding RNA and its important 3' end functional motif in colorectal cancer metastasis[J]. *International Journal of Oncology*, 2011, 39(1): 169–175.
- [15] Jiao S, Gilbert DM. Complex correlations: replication timing and mutational landscapes during cancer and genome evolution[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2014, 25(1): 93–100.
- [16] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes[J]. *Science*, 2013, 339(6127): 1546–1558.
- [17] Song SJ, Ito K, Ala U, et al. The oncogenic microRNA miR-22 targets the TET2 tumor suppressor to promote hematopoietic stem cell self-renewal and transformation[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(1): 87–101.
- [18] Xun W, Honggang Y, Xinyao L, et al. MiR-22 suppresses the proliferation and invasion of gastric cancer cells by inhibiting CD151[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2014, 445(1): 175–179.
- [19] Guo MM, Hu LH, Wang YQ, et al. miR-22 is down-regulated in gastric cancer, and its overexpression; inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor Sp1[J]. *Medical Oncology*, 2013, 30(2): 542.
- [20] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646–674.
- [21] Wang Y, Shi J, Chai K, et al. The role of snail in EMT and tumorigenesis[J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2013, 13(9): 963–972.
- [22] Na RS, Jeong EH, Chang IC, et al. Overexpression of Snail is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 521.
- [23] He H, Chen W, Wang X, et al. Snail is an independent prognostic predictor for progression and patient survival of gastric cancer[J]. *Cancer Science*, 2012, 103(7): 1296–1303.

(责任编辑:张辉洁)