

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001583

miR-629-5p 对胃癌细胞生物学行为的影响 及其靶基因 MTRF1L 的鉴定

何 清, 李照东, 吴小翎

(重庆医科大学附属第二医院消化内科, 重庆 400010)

【摘要】目的:研究 miR-629-5p 对胃癌细胞生物学行为的影响并鉴定其靶基因。**方法:**通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测 miR-629-5p 在 16 例胃癌组织和 3 种胃癌细胞中的表达水平; 将细胞实验分为 2 个组: 实验组 (IN) 和对照组 (NC); 转染 miR-629-5p 抑制剂下调胃癌细胞 MKN-45 中 miR-629-5p 的表达; CCK-8 实验和平板克隆实验检测 MKN-45 增殖; Transwell 小室实验和划痕实验检测 MKN-45 迁移和侵袭; 细胞流式技术检测 MKN-45 凋亡; 通过 miRWalk2.0 工具预测 miR-629-5p 的靶基因, Western blot 检测 MKN-45 中线粒体样转录释放因子 1 (mitochondrial translational release factor 1 like, MTRF1L) 蛋白表达。**结果:**与癌旁组织[1.574(0.197, 4.503)]相比, 胃癌组织中 miR-629-5p 相对表达量[2.081(0.231, 7.216)]明显增加($P=0.003$); 与正常胃黏膜细胞(1.017 ± 0.226)相比, 胃癌细胞中 miR-629-5p 相对表达量(MKN-28: 3.040 ± 0.506; MKN-45: 5.924 ± 0.403; SCG-7901: 3.377 ± 0.372)均明显增加($P=0.000$)。下调 miR-629-5p 表达后, 胃癌细胞 MKN-45 的增殖减慢(IN: 64 ± 12; NC: 102 ± 12; $P=0.018$), 迁移(IN: 106 ± 9; NC: 194 ± 29; $P=0.008$)和侵袭(IN: 25 ± 7; NC: 60 ± 9; $P=0.007$)能力减弱, 凋亡细胞数增加[IN: (19.257 ± 2.440)%; NC: 11.687 ± 2.237; $P=0.017$]。miR-629-5p 预测的靶基因共有 46 个, 下调 miR-629-5p 的表达后, MTRF1L 表达量明显增加(IN: 0.923 ± 0.101; NC: 0.556 ± 0.026; $P=0.004$)。**结论:**miR-629-5p 在胃癌中表达上调, 可促进 MKN-45 的增殖, 增强 MKN-45 迁移和侵袭能力, 抑制 MKN-45 凋亡; MTRF1L 可能是 miR-629-5p 的靶基因之一。

【关键词】胃癌; miR-629-5p; 生物信息学; 线粒体样转录释放因子 1

【中图分类号】R735.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-11-11

Effects of miR-629-5p on biological behavior of gastric cancer cells and identification of its target gene MTRF1L

He Qing, Li Zhaodong, Wu Xiaoling

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

【Abstract】Objective: To study the effects of miR-629-5p on the biological behavior of gastric cancer cells and to identify its target gene. **Methods:** Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-629-5p in 16 gastric cancer tissues and 3 gastric cancer cell lines. The cell experiment was divided into two groups: the experimental group (IN) and control group (NC). Transfecting miR-629-5p inhibitor was used to down-regulate the miR-629-5p expression of MKN-45. CCK-8 assay and plate cloning assay was used to detect cell proliferation. Transwell chamber assay and wound healing assay was used to detect invasion and migration of MKN-45, and flow cytometry assay was used to detect apoptosis of MKN-45. MiRWalk2.0 was used to predict target genes of miR-629-5p, and Western blot was used to detect the expression of mitochondrial translational release factor 1 like (MTRF1L) in MKN-45. **Results:** The expression of miR-629-5p was significantly increased in gastric cancer tissues[2.081(0.231, 7.216)] compared with that of paired normal gastric tissue[1.574(0.197, 4.503)] ($P=0.003$). The expression of miR-629-5p was significantly increased in gastric cancer cell lines (MKN-28: 3.040 ± 0.506; MKN-45: 5.924 ± 0.403; SCG-7901: 3.377 ± 0.372) compared with that of GES-1 (1.017 ± 0.226) ($P=0.003$). After down-regulation of miR-629-5p expression, the proliferation of MKN-45 slowed down (IN: 64 ± 12; NC: 102 ± 12; $P=0.018$), the abilities of migration (IN: 106 ± 9; NC: 194 ± 29; $P=0.008$) and invasion (IN: 25 ± 7; NC: 60 ± 9; $P=0.007$) decreased, and the number of apoptotic cells increased [IN: (19.257 ± 2.440)%; NC: 11.687 ± 2.237; $P=0.017$]. There were 46 target genes predicted by miR-

作者介绍: 何 清, Email: 122641433@qq.com,

研究方向: 胃癌的分子生物学研究。

通信作者: 吴小翎, Email: wuxiaoling@cqmu.edu.cn。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180408.1405.008.html>
(2018-04-08)

629-5p, one of which is MTRF1L. The down-regulation of miR-629-5p increased the expression of MTRF1L (IN: 0.923 ± 0.101 ; NC: 0.556 ± 0.026 ; $P=0.004$). **Conclusion:** The expression of miR-629-5p is up-regulated in gastric cancer tissues and cell lines. miR-629-5p can promote the proliferation, enhance the migration and invasion abilities, and inhibit the apoptosis of MKN-45. MTRF1L may be one of miR-629-5 target genes.

【Key words】gastric cancer; miR-629-5p; bioinformatics; mitochondrial translational release factor 1 like

胃癌是全世界常见的恶性肿瘤之一,我国为胃癌的高发地区之一^[1]。每年我国新发病例约 40 万例,占世界总发病例的 42%,死亡人数达 30 万^[2]。胃癌的诊断主要靠内镜和病理检查,但早期胃癌缺乏症状和体征,导致大部分患者就诊时已是进展期胃癌^[3-4]。进展期胃癌的治疗方式主要是手术切除,但术后 5 年生存率也仅仅只有 30%~40%^[5-7],所以进一步探索胃癌的发病机制至关重要,尤其是胃癌早期临床诊断。近年来,大量研究发现 miRNA 可影响胃癌生长、侵袭和转移^[8-10],其表达特征与胃癌类型和临床病理有关^[11],并与胃癌患者的预后密切相关^[12-13]。miR-629 是 miRNA 中重要的一员,Navon 等^[14]发现它在 8 种肿瘤组织(乳腺癌、结肠癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、前列腺癌和睾丸癌)中均高表达。Shin 等发现胃癌患者血清中 miR-629 明显升高,可以作为早期诊断胃癌的血清生物标志物^[15]。但是,miR-629-5p 在胃癌发生发展中的作用仍不清楚,本研究旨在初步探讨 miR-629-5p 对胃癌细胞 MKM-45 生物学行为的影响,鉴定其靶基因,从而为胃癌早期临床诊断和治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 胃癌组织和细胞系 16 例胃癌及其配对组织是于 2016 年 10 月至 2017 年 6 月在重庆医科大学附属第二医院胃癌患者的手术切除标本,在距胃癌远端 5 cm 处取正常胃组织作为癌旁组织,所有病例术前均未接受放疗或化疗,所有标本经病理学检查证实。人胃癌细胞株 MKN-45 由重庆医科大学生命科学院实验室惠赠。人胃癌细胞株 MKN-28、SGC-7901 和人正常胃黏膜细胞株 GES-1 由重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心惠赠。

1.1.2 主要试剂 新鲜胎牛血清、DMEM 高糖培养基均购自美国 HyClone 公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;miR-629-5p inhibitor、miRNA inhibitor NC 和 RNAi-Mate 购自上海吉玛制药技术有限公司;CCK-8

购自东仁化学科技(上海)有限公司;鼠抗人 MTRF1L 单克隆抗体购自 NOVUS 公司,鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;羊抗鼠 IgG 二抗购自南京生兴生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 将胃癌组织及配对的癌旁组织用匀浆管研磨成匀浆,4 种细胞株去培养基并用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)清洗 3 次,按试剂盒说明书提取 RNA 及反转录成 cDNA,然后进行实时荧光定量 PCR 检测 miR-629-5p 在胃癌组织中的表达。miR-629-5p 引物序列 5'-CGTGGGTT-TACGTTGGGAGAACT-3',内参 U6 基因引物序列 5'-CTC-GCTTCGGCAGCACA-3'。扩增条件:预变性 94 ℃ 30 s,PCR 反应 94 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s,共 40 个循环,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miR-629-5p 的相对表达量^[16]。

1.2.2 细胞转染 取对数期生长的细胞 2×10^5 个接种于 6 孔板中,24 h 后按说明书步骤用 200 pmol RNAi-Mate 分别转染 4 μ L miR-629-5p inhibitor(记为 IN 组)和 4 μ L inhibitor NC(记为 NC 组)。miR-629-5p inhibitor 序列为 5'-AGUUC-UCCCAACGUAAACCCA-3'。miRNA inhibitor NC 序列为 5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3'。转染 48 h 后使用 qRT-PCR 方法检测 miR-629-5p 在两组细胞中的表达。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miR-629-5p 的相对表达量。

1.2.3 CCK-8 实验 将转染 48 h 后的 IN 组和 NC 组的 MKN-45 细胞消化离心后,用含血清的培养基重悬,调整细胞浓度为 4×10^4 个/mL,取 100 μ L 细胞悬液接种于 96 孔板中,置于 37 ℃、5%CO₂ 细胞培养箱中静置培养,分别于 4 h、1 d、2 d、3 d 和 4 d 向每孔加入 10 μ L CCK-8,孵育 3 h 后检测其在 450 nm 处的吸光度(absorbance, A)值。

1.2.4 平板克隆实验 将上述细胞重悬液调整细胞浓度为 15×10^5 个/mL,取 1 μ L 细胞悬液接种于 6 孔板中,加入 2 mL 含血清的培养基,并轻轻转动,使细胞分散均匀。置于 37 ℃、5%CO₂ 细胞培养箱中静置培养 2 周后, PBS 小心浸洗 2 次,4%甲醛固定 20 min,0.1%结晶紫染色 20 min 后,洗去染色液,空气干燥,用肉眼直接计数克隆。

1.2.5 Transwell 小室实验 将转染 48 h 后的 IN 组和 NC 组的 MKN-45 细胞消化离心后,用无血清的培养基重悬,调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL。将 Transwell 小室置于 24 孔板中,上室加入 200 μ L 细胞悬液,下室加入 600 μ L 含 10%胎牛血

清的 DMEM 培养基,将 24 孔板置于培养箱中继续培养。24 h 后取出小室,用棉签轻轻拭去上室细胞,PBS 小心清洗 2 次,4% 甲醛固定 20 min,0.1% 结晶紫染色 20 min,PBS 清洗 3 次,干燥后显微镜下照相,随机选 3 个视野进行拍照。Transwell 小室侵袭实验前,将基质胶用无血清培养基按 1:8 的比例稀释后取 60 μ L 加入小室,其余步骤同前,48 h 后进行固定染色。

1.2.6 划痕实验 待转染 72 h 后的 IN 组和 NC 组的 MKN-45 细胞融合度达 100%时,用 1 mL 枪头比着直尺垂直画相距 0.5 cm 的 3 条直线,并用 PBS 冲洗 3 遍,去掉划落细胞后,加入 2 mL 无血清培养基继续培养,于 0、2、3 d 观察划痕宽度并拍照。

1.2.7 细胞流式技术 将转染 48 h 后的 IN 组和 NC 组的 MKN-45 细胞消化离心后,用 PBS 清洗 2 遍后制成 500 μ L PBS-细胞悬液后送至重庆医科大学生命科学院检测细胞凋亡情况。

1.2.8 生物信息学分析 使用 miRWalk2.0 工具预测 miR-629-5p 的靶基因,检索数据库为 miRWalk、miRanda、miRDB、miRMap、Pictar2、PITA、RNA22、RNAhybrid 和 Targetscan 9 个常用数据库,至少 8 个数据库中同时出现的基因被认为是 miR-629-5p 的靶基因。根据以上预测的靶基因信息,在 WebGestalt 采用 Overrepresentation Enrichment Analysis (ORA)富集方法,对靶基因进行 KEGG pathway 和 GO 富集预测。最后,在 OncomiR 上对 miR-629-5p 表达量与 413 例胃腺癌(stomach adenocarcinoma,STAD)患者生存率之间关系进行生存分析。

1.2.9 Western blot 提取转染 72 h 后的 IN 组和 NC 组的 MKN-45 细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后,取 60 μ g 蛋白加入 SDS-PAGE 凝胶小孔进行电泳(浓缩胶 80 V,分离胶 120 V),电泳后低温(4 $^{\circ}$ C,90 mA)电转过夜,室温条件下在摇床上封闭液封闭 4 h,加入一抗(1:1 000 鼠抗人 MTRF1L 单体,1:1 000 鼠抗人 GAPDH 单抗)4 $^{\circ}$ C 过夜,PBST 洗膜 3 次,加入二抗(1:2 000 羊抗鼠 IgG 二抗)37 $^{\circ}$ C,2 h,PBST 洗膜 3 次后曝光显影。用 Quantify One 软件分析条带灰度值。

1.3 统计方法

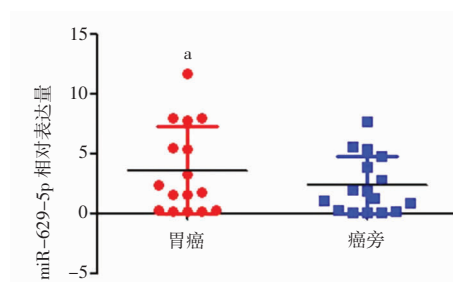
用 SPSS 17.0 进行数据统计分析,用 GraphPad Prism 5 软件作图,所有实验均重复 3 次。正态分布数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间的比较采用 *t* 检验或重复测量方差分析,多组之间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法。非正态分布数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两组之间的比较用配对秩和检验;生存分析比较采用 log-rank 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

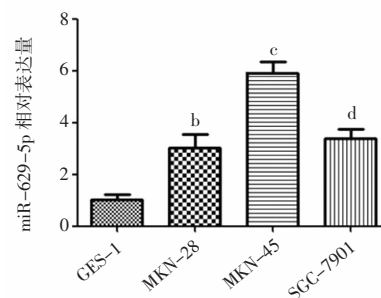
2.1 胃癌组织和胃癌细胞中 miR-629-5p 的相对表达

qRT-PCR 实验结果显示:与癌旁组织[1.574 (0.197, 4.503)]相比,胃癌组织中 miR-629-5p 的相对表达[2.081

(0.231, 7.216)]明显增加($Z=-2.947, P_a=0.003$,图 1);与正常胃黏膜细胞 GES-1 (1.017 $\pm$ 0.226)相比,胃癌细胞 MKN-28 (3.040 $\pm$ 0.506)、MKN-45 (5.924 $\pm$ 0.403)和 SCG-7901 (3.377 $\pm$ 0.372)中 miR-629-5p 的相对表达均明显增加($F=79.954, P=0.000$,图 1)。



a: 与癌旁组织相比, $P=0.003$

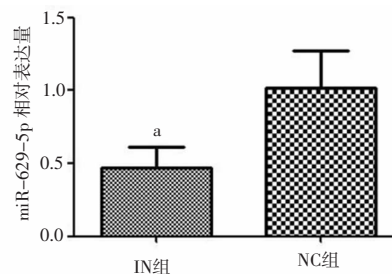


b: 与 GES-1 相比, $P=0.000$; c: 与 GES-1 相比, $P=0.000$; d: 与 GES-1 相比, $P=0.000$

图 1 miR-629-5p 在胃癌组织和胃癌细胞中的相对表达量
Fig.1 Relative expression of miR-629-5p in gastric cancer tissues and cell lines

2.2 转染抑制剂下调 miR-629-5p 在 MKN-45 中的表达

IN 组和 NC 组 qRT-PCR 结果显示:与 NC 组 (1.020 $\pm$ 0.253)相比,IN 组细胞中的 miR-629-5p (0.472 $\pm$ 0.141)的表达明显下调($t=3.278, P=0.031$,图 2)。



a: 与 NC 组相比, $P=0.031$

图 2 MKN-45 转染抑制剂后 miR-629-5p 的相对表达量
Fig.2 Relative expression of miR-629-5p in MKN-45 after transfection with inhibitor

2.3 miR-629-5p 对 MKN-45 细胞增殖的影响

CCK-8 实验结果显示:NC 组细胞 1~4 d 的 A 值依次分

别为 1.034 ± 0.008 、 1.289 ± 0.006 、 2.431 ± 0.007 和 2.720 ± 0.072 ; 与之相比, IN 组细胞在 1 d (0.791 ± 0.023)、2 d (0.911 ± 0.042)、3 d (1.917 ± 0.011)、4 d (2.035 ± 0.022) 的 A 值均明显降低 ($F_{\text{分组}}=937.648, P_{\text{分组}}=0.000; F_{\text{时间}}=5\ 806.458, P_{\text{时间}}=0.000; F_{\text{分组} \times \text{时间}}=131.780, P_{\text{分组} \times \text{时间}}=0.000$; 图 3)。

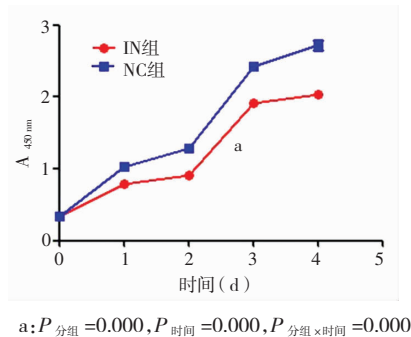


图 3 CCK-8 实验检测 miR-629-5p 对 MKN-45 细胞增殖的影响
Fig.3 Effect of miR-629-5p on proliferation in MKN-45 by CCK-8 assay

平板克隆实验结果显示: IN 组细胞克隆形成数 (64 ± 12) 明显少于 NC 组细胞克隆形成数 (102 ± 12) ($t=2.892, P=0.018$, 图 4)。

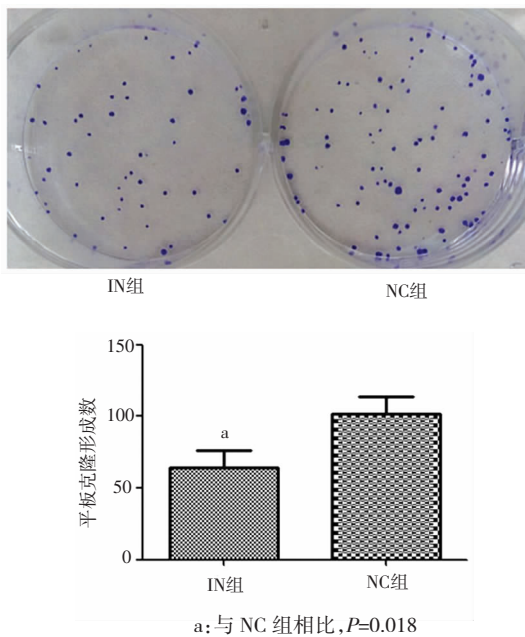


图 4 平板克隆实验检测 miR-629-5p 对 MKN-45 细胞增殖的影响
Fig.4 Effect of miR-629-5p on proliferation in MKN-45 by plate cloning assay

2.4 miR-629-5p 对 MKN-45 细胞迁移和侵袭能力的影响

Transwell 小室实验结果显示: NC 组迁移和侵袭实验中穿膜细胞数分别为 194 ± 29 和 60 ± 9 , 与之相比, IN 组迁移和侵袭实验穿膜细胞数 [$(106 \pm 9), (25 \pm 7)$] 明显减少 ($t_a=4.956, P_a=0.008; t_b=5.202, P_b=0.007$; 图 5、图 6)。

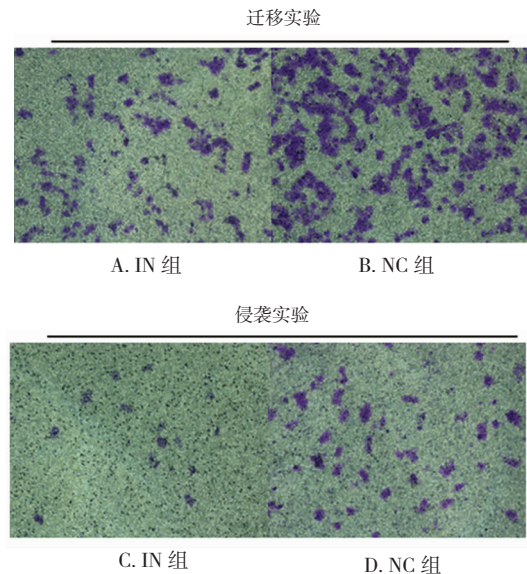
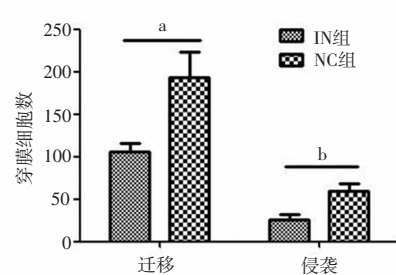


图 5 Transwell 小室实验 (结晶紫, 200 ×)

Fig.5 Transwell chamber assay (crystal violet, 200 ×)



a: 与 NC 组相比, $P_a=0.008$; b: 与 NC 组相比, $P_b=0.007$

图 6 Transwell 实验 miR-629-5p 对 MKN-45 细胞迁移侵袭能力的影响

Fig.6 Effect of miR-629-5p on invasion and migration in MKN-45 by Transwell chamber assay

划痕实验结果显示: IN 组细胞 2 d (0.687 ± 0.026) 和 3 d (0.520 ± 0.023) 的划痕宽度均明显宽于 NC 组细胞 ($F_{\text{分组}}=245.903, P_{\text{分组}}=0.000; F_{\text{时间}}=1\ 585.891, P_{\text{时间}}=0.000; F_{\text{分组} \times \text{时间}}=63.367, P_{\text{分组} \times \text{时间}}=0.001$; 图 7、图 8)。

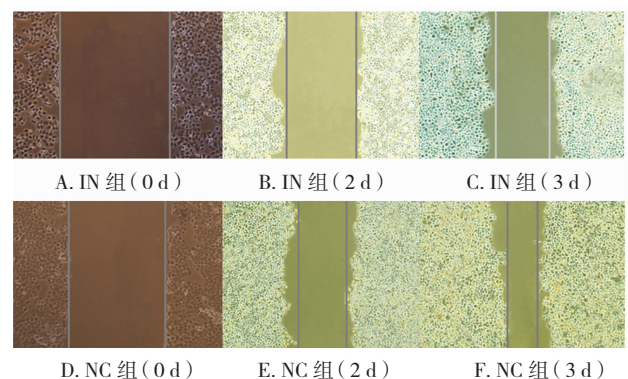
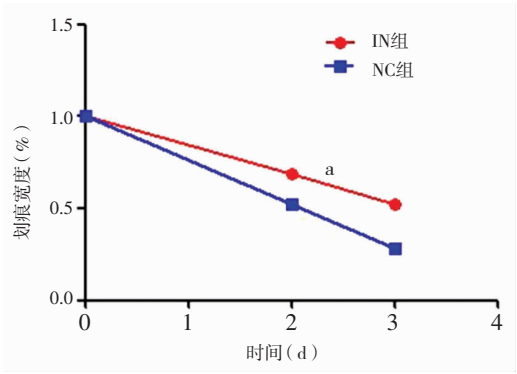


图 7 划痕实验 (200 ×)

Fig.7 Wound healing assay (200 ×)



a: 与 NC 组相比, $P_{\text{分组}}=0.000$, $P_{\text{时间}}=0.000$, $P_{\text{分组} \times \text{时间}}=0.001$

图 8 划痕实验检测 miR-629-5p 对 MKN-45 细胞迁移的影响
Fig.8 Effect of miR-629-5p on migration in MKN-45 by wound healing assay

2.5 miR-629-5p 对 MKN-45 细胞凋亡的影响

流式细胞学实验结果显示:IN 组细胞凋亡数 (19.257 ± 2.440) 明显高于 NC 组 (11.687 ± 2.237) ($t=3.960$, $P=0.017$,

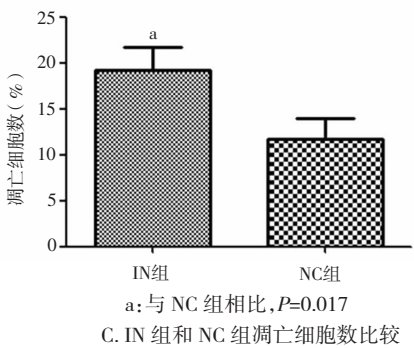
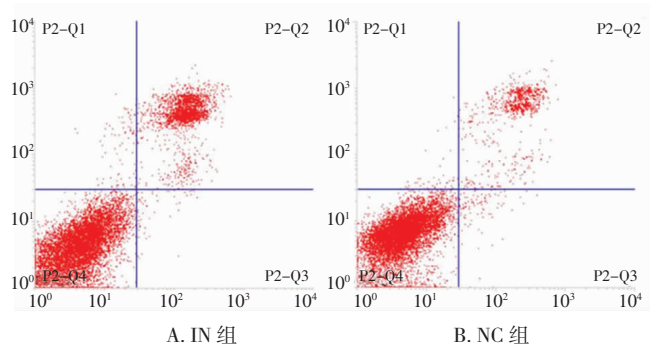


图 9 miR-629-5p 对 MKN-45 细胞凋亡的影响
Fig.9 Effect of miR-629-5p on apoptosis in MKN-45

表 1 miR-629-5p 的靶基因
Tab.1 Target genes of miR-629-5p

miRNA	靶基因
hsa-miR-629-5p	MTRF1L、BCAT1、ZFP36L1、FBN2、TNFRSF11B、PPM1BPRLR、PURB、ATXN1、FZD3、ATG5、CTR9、TSHZ1、FBX-O28、NCS1、SUSD5、RBMX、RRP15、FAM49A、GINS4、LONRF1、CYB5D1、PLEKHH2、MTPN、DOK6、NAP1L5、TCAIM、CCR1、FRZB、HNMT、POLR2C、SFRP2、ZNF70、TSPAN2、ZDHHC17、LTN1、APPL1、KLHL13、PAXBP1、TPH2、ELOVL4、IQCK、ZFP3、CCDC117、FAM217A、SNX30

表 2 靶基因 KEGG 富集结果
Tab.2 KEGG pathway analysis of the target genes

Pathway ID	Pathway 名称	数目	P 值	靶基因
hsa04211	Longevity regulating pathway	2	0.000	APPL1、ATG5
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	3	0.000	CCR1、TNFRSF11B、PRLR
hsa04310	Wnt signaling pathway	2	0.000	SFRP2、FZD3
hsa00770	Pantothenate and CoA biosynthesis	1	0.000	BCAT1
hsa01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism	1	0.000	BCAT1

图9)。

2.6 生物信息学

通过 miRWalk2.0 工具预测出包括线粒体样转录释放因子 1(mitochondrial translational release factor 1 like,MTRF1L)在内的 46 个靶基因 ($P<0.05$, 表 1), 对靶基因进行 KEGG pathway 和 GO 富集预测,KEGG pathway 分析结果显示 miR-629-5p 可能通过相关靶基因参与寿命调控通路、细、胞因子与受体作用通路、Wnt 信号通路、泛酸盐和辅酶 A 生物合成通路和 β -氧化羧酸代谢通路 ($P<0.05$, 表 2)。GO 富集到较多的结果,按照显著性,对前 10 结果进行分析,显示其靶基因主要影响胚胎发育、细胞分化和跨膜信号受体活动等方面 ($P<0.05$, 表 3)。在 OncomiR 上对 413 例胃腺癌患者数据进行生存分析,结果显示胃癌患者生存率与 miR-629-5p 并无关系 ($P=0.872$, 图 10)。

2.7 MKN-45 中 MTRF1L 蛋白的表达

Western blot 结果显示,与 NC 组 (0.556 ± 0.026) 相比,IN 组 MKN-45 中 MTRF1L 相对表达 (0.923 ± 0.101) 明显增加 ($t=6.079$, $P=0.004$, 图 11)。

表 3 靶基因的 GO 富集结果
Tab.3 GO-analysis of the target genes

GO-ID	GO名称	数目	P 值
GO:0048598	embryonic morphogenesis	7	0.000
GO:0045600	positive regulation of fat cell differentiation	3	0.000
GO:0060026	convergent extension	2	0.000
GO:0045637	regulation of myeloid cell differentiation	4	0.000
GO:0030099	myeloid cell differentiation	5	0.000
GO:2000026	regulation of multicellular organismal development	11	0.000
GO:0036342	post-anal tail morphogenesis	2	0.000
GO:0001832	blastocyst growth	2	0.000
GO:0006497	protein lipidation	3	0.000
GO:0009790	embryo development	8	0.000
GO:0043596	nuclear replication fork	2	0.000
GO:0005657	replication fork	2	0.000
GO:0031261	DNA replication preinitiation complex	1	0.000
GO:0044451	nucleoplasm part	5	0.000
GO:0044427	chromosomal part	5	0.000
GO:0016593	Cdc73/Paf1 complex	1	0.000
GO:0031298	replication fork protection complex	1	0.000
GO:0008290	F-actin capping protein complex	1	0.000
GO:0016591	DNA-directed RNA polymerase II, holoenzyme	2	0.000
GO:0001527	microfibril	1	0.000
GO:0042813	Wnt-activated receptor activity	3	0.000
GO:0017147	Wnt-protein binding	3	0.000
GO:0003729	mRNA binding transcriptional repressor activity	3	0.000
GO:0001227	RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific binding	3	0.000
GO:0016149	translation release factor activity, codon specific	1	0.000
GO:0030023	extracellular matrix constituent conferring elasticity	1	0.000
GO:0004888	transmembrane signaling receptor activity	7	0.000
GO:0034046	poly (G) binding	1	0.000
GO:0042979	ornithine decarboxylase regulator activity	1	0.000
GO:0061133	endopeptidase activator activity	1	0.000

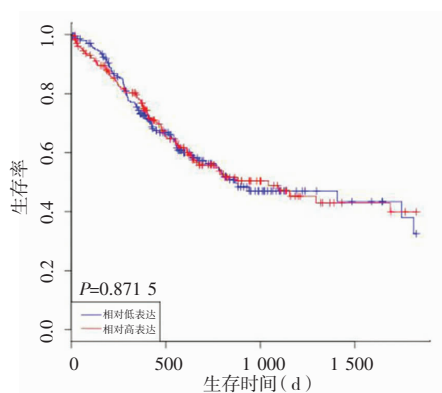


图 10 413 例胃腺癌患者的生存分析

Fig.10 Survival analysis of 413 patients with stomach adenocarcinoma

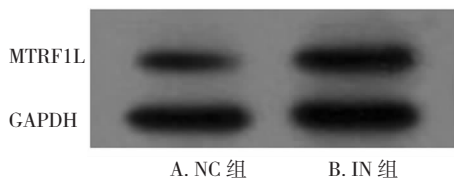


图 11 Western blot 检测 MKN-45 中 MTRF1L 蛋白的表达量

Fig.11 MTRF1L protein expression in MKN-45 by Western blot

3 讨论

miRNA 是一类小分子非编码小分子 RNA, 可以与靶 mRNA 的 3' 非编码区互补特异性结合, 使 mRNA 降解或者抑制 mRNA 翻译, 从而抑制靶基因表达^[17]。miRNA 调控着超过 1/3 的人类基因^[18], 参与细胞生长、增殖、分化、凋亡和免疫等多种生物学功能^[19]。多项研究发现 miR-629 在多种肿瘤中都扮演着重要的角色^[20-21], 但在胃癌中研究仍然较少。本研究用 qRT-PCR 实验发现 16 例胃癌组织中 miR-629-5p 表达量明显高于配对的癌旁组织, 3 种胃癌细胞中 iR-629-5p 表达量也均高于正常胃黏膜细胞, 推测它在胃癌发生发展中可能发挥致癌的作用。然后通过一系列实验证明 miR-629-5p 可以促进胃癌细胞的增殖, 增强胃癌细胞迁移和侵袭能力, 抑制胃癌细胞的凋亡。

miR-629 通过直接抑制肝细胞核因子 4 (hepa-

tocyte nuclear factor 4 alpha, HNF4 α)促进肝肿瘤的发生^[22],也可以通过抑制 Forkhead box O3(FOXO3)促进胰腺癌细胞增殖和侵袭^[23],但在胃癌中的作用机制却不清楚。通过生物信息学的方法寻找出 46 个 miR-629-5p 的可能靶基因,KEGG pathway 和 GO 富集预测发现它们参与寿命调控、细胞因子与受体作用通路和 Wnt 信号等通路,影响胚胎发育、细胞分化和跨膜信号受体活动等多个方面,但对 413 例胃癌患者进行生存分析发现胃癌患者生存率与 miR-629-5p 并无关系。MTRF1L 是线粒体内的一种蛋白质,可通过结合 UAA 或 UAG 终止密码子使线粒体发生的翻译停止^[24],但下调 MTRF1L 没有影响线粒体里编码的蛋白质,而线粒体中活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)增加^[25]。通过 Western blot 证明下调 miR-629-5p 后,胃癌细胞 MTRF1L 表达增加,推测 miR-629-5p 在胃癌细胞中抑制 MTRF1L 的表达使线粒体氧化磷酸化作用增强,促进癌细胞增殖、迁移及侵袭,MTRF1L 可能是 miR-629-5p 靶基因之一。

参 考 文 献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBO-CAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-386.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] 周平红, 陈巍峰, 何梦江. 早期胃癌的规范化内镜诊断及治疗[J]. *中国实用外科杂志*, 2014, 34(7): 604-607.
- [4] Layke JC, Lopez PP. Gastric cancer: diagnosis and treatment options[J]. *Am Fam Physician*, 2004, 69(5): 1133-1140.
- [5] 顾本兴, 孙晓南. 进展期胃癌治疗进展[J]. *新乡医学院学报*, 2010, 27(1): 93-96.
- [6] Son T, Hyung WJ. Laparoscopic gastric cancer surgery: current evidence and future perspectives[J]. *World J Gastroenterology*, 2016, 22(2): 727-735.
- [7] Hundahl SA, Phillips JL, Menck HR. The National Cancer Data Base Report on poor survival of U.S. gastric carcinoma patients treated with gastrectomy[J]. *Cancer*, 2000, 88(4): 921-932.
- [8] Liao A, Tan G, Chen L, et al. RASSF1A inhibits gastric cancer cell proliferation by miR-711-mediated downregulation of CDK4 expression[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5842-5851.
- [9] Shin JY, Kim YI, Cho SJ, et al. MicroRNA 135a suppresses lymph node metastasis through down-regulation of ROCK1 in early gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85205.
- [10] Zheng L, Qi T, Yang D, et al. microRNA-9 suppresses the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer cells through targeting cyclin D1 and Ets1[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55719.
- [11] Shin VY, Chu KM. MiRNA as potential biomarkers and therapeutic targets for gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(30): 10432-10439.
- [12] Lim JY, Yoon SO, Seol SY, et al. Overexpression of miR-196b and HOXA10 characterize a poor-prognosis gastric cancer subtype[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(41): 7078-7088.
- [13] Chen DL, Zhang DS, Lu YX, et al. microRNA-217 inhibits tumor progression and metastasis by downregulating EZH2 and predicts favorable prognosis in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13): 10868-10879.
- [14] Navon R, Wang H, Steinfeld I, et al. Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types[J]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e8003.
- [15] Shin VY, Ng EK, Chan VW, et al. A three-miRNA signature as promising non-invasive diagnostic marker for gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 202.
- [16] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [17] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [18] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20.
- [19] Tüfekci KU, Meuwissen RL, Genç S. The role of microRNAs in biological processes[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1107: 15-31.
- [20] Phuah NH, Azmi MN, Awang K, et al. Suppression of microRNA-629 enhances sensitivity of cervical cancer cells to 1'-S-1'-acetoxychavicol acetate via regulating RSU1[J]. *Oncotargets Ther*, 2017, 10: 1695-1705.
- [21] Cazzoli R, Buttitta F, Di Nicola M, et al. MicroRNAs derived from circulating exosomes as non-invasive biomarkers for screening and diagnose lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(9): 1156-1162.
- [22] Hatziaepostolou M, Polytarchou C, Aggelidou E, et al. An HNF4 α -miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis[J]. *Cell*, 2011, 147(6): 1233-1247.
- [23] Yan H, Li Q, Wu J, et al. MiR-629 promotes human pancreatic cancer progression by targeting FOXO3[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3154.
- [24] Nozaki Y, Matsunaga N, Ishizawa T, et al. HMR1L is a human mitochondrial translation release factor involved in the decoding of the termination codons UAA and UAG[J]. *Genes Cells*, 2008, 13(5): 429-438.
- [25] Soleimanpour-Lichaei HR, Kühl I, Gaisne M, et al. mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG[J]. *Mol Cell*, 2007, 27(5): 745-757.

(责任编辑: 冉明会)