

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001994

miR-335-5p 通过靶向 Oct4 调控胃癌细胞的增殖

程安琪, 彭旭东, 刘光艺, 王子卫

(重庆医科大学第一附属医院胃肠外科, 重庆 400000)

【摘要】目的:研究微小(miR)-335-5p 对胃癌细胞增殖的影响及其机制。**方法:**采用荧光定量 PCR 检测 miR-335-5p 在胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、MKN-28、MKN-45 和人正常胃黏膜上皮细胞系 GES-1 中的表达水平, 利用 miR-335-5p 过表达慢病毒及封闭慢病毒分别感染 SGC-7901 和 BGC-823 细胞株, 实验分为 SGC-7901 细胞中 miR-335-5p 组(转染过表达 miR-335-5p 组)和阴性对照组(空病毒组, NC), BGC-823 细胞中 antago-miR-335-5p 组(转染封闭 miR-335-5p 慢病毒)和阴性对照组(空病毒组, NC)。通过 CCK-8 实验、平板克隆实验、EdU 实验检测 miR-335-5p 对细胞增殖的影响, 用生物信息学软件预测 miR-335-5p 可能的靶基因, 通过 Western blot 验证 miR-335-5p 对靶基因的调控作用并检测 AKT 及 pAKT 的表达。**结果:**miR-335-5p 在胃癌细胞系中表达明显下降。CCK-8 实验、平板克隆实验及 EdU 实验中过表达 miR-335-5p 组光密度值、克隆形成率、EdU 阳性细胞率均低于其阴性对照组, 而封闭 miR-335-5p 组光密度值、克隆形成率、EdU 阳性细胞率均高于其阴性对照组。同时用生物信息学软件预测了 Oct4 作为 miR-335-5p 的靶基因, Western blot 表明过表达 miR-335-5p 组 Oct4 的表达量 (0.469 ± 0.054) 明显低于阴性对照组 (0.670 ± 0.045) ($P=0.008$), 封闭 miR-335-5p 组 Oct4 的表达 (0.804 ± 0.046) 高于阴性对照组 (0.600 ± 0.073) ($P=0.015$), 同时双荧光素酶报告实验证明 miR-335-5p 能够靶向 Oct4; 过表达 miR-335-5p 组中 pAKT 的表达量 (0.525 ± 0.046) 较阴性对照组 (0.847 ± 0.053) 有所下降 ($P=0.001$), 封闭 miR-335-5p 组 (0.841 ± 0.069) 中 pAKT 的表达量较阴性对照组 (0.563 ± 0.063) 有所升高 ($P=0.007$)。**结论:**miR-335-5p 可以通过靶向 Oct4 抑制 AKT 通路从而抑制胃癌细胞的增殖。

【关键词】miR-335-5p; 胃癌; 细胞增殖; Oct4**【中图分类号】**R735.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-11-13

miR-335-5p inhibits the proliferation of gastric cancer cells by targeting Oct4

Cheng Anqi, Peng Xudong, Liu Guangyi, Wang Ziwei

(Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of miR-335-5p on the proliferation of gastric cancer cells and its underlying mechanism. **Methods:** The expression of miR-335-5p in gastric cancer cell lines BGC-823, MKN-28, MKN-45 and normal gastric mucosal epithelial cell line GES-1 were tested by qRT-PCR. SGC-7901 and BGC-823 cell lines were transfected by overexpression and antagonist lentivirus respectively and the experimental groups were divided into: miR-335-5p group (transfected with miR-335-5p overexpression lentivirus) and negative control group (transfected with empty lentivirus, NC) in SGC-7901 cell line, and antago-miR-335-5p group (transfected with antagonist lentivirus) and negative control group (transfected with empty lentivirus, NC) in BGC-823 cell line. The effect of miR-335-5p on the proliferation of gastric cancer cells was tested by CCK-8 assay, colony formation assay and EdU assay. The target gene of miR-335-5p was predicted by bioinformatics software. Western blot was selected to test the expression level of Oct4, AKT and pAKT. **Results:** The expression level of miR-335-5p was downregulated in gastric cancer cell lines compared with that in normal gastric mucosal epithelial cell line. CCK-8 assay, colony formation assay and EdU assay showed that the absorbance (A) value, colony formation number and EdU positive cell in overexpression miR-335-5p group were lower than those in NC group while antago-miR-335-5p group had higher A value, colony formation number and EdU positive cell than NC group. Oct4 was predicted as a target gene of miR-335-5p. The protein expression level of Oct4 was lower in miR-335-5p group (0.469 ± 0.054) than in NC group (0.670 ± 0.045) ($P=0.008$); the protein expression level of Oct4 was higher in antago-miR-335-5p group (0.804 ± 0.046) than in NC group (0.600 ± 0.073) ($P=0.015$), and dual luciferase reporter assay was conducted to prove that

作者介绍: 程安琪, Email: 769011718@qq.com,

研究方向: 胃肠道肿瘤的基础研究。

通信作者: 王子卫, Email: wangziwei571@sina.com。

基金项目: 国家临床重点专科建设资助项目(编号: [2012]649)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190320.1006.008.html>

(2019-03-20)

miR-335-5p could target Oct4. The expression level of pAKT was lower in overexpression miR-335-5p group (0.525 ± 0.046) than in its NC group (0.847 ± 0.053) ($P=0.001$); the expression level of pAKT was higher in antago-miR-335-5p group (0.841 ± 0.069) than in NC group (0.563 ± 0.063) ($P=0.007$). **Conclusion:** miR-335-5p works as a tumor suppressor to inhibit the proliferation of gastric cancer cells by targeting Oct4 to inhibit the AKT pathway.

【Key words】miR-335-5p; gastric cancer; cell proliferation; Oct4

根据 2012 年全球癌症数据研究,胃癌的发病率位居全球第四,每年全球有超过 95 万例新发胃癌病例,胃癌的病死率则在癌症导致的死亡中位居第二,每年约有 72 万例胃癌患者死亡^[1]。尽管对于胃癌的流行病学、病理学、分子机制、治疗手段及策略有着越来越多的成果,但我国早期胃癌诊断率很低,严重影响患者预后,因此寻找胃癌早期诊断的分子标志物以及治疗策略十分重要。

微小 RNA(miRNA)是一类大小为 20~22 核苷酸的非编码小 RNA,能够通过靶向目的基因的 3' 非编码区抑制基因的表达^[2]。在不同肿瘤中,miRNA 起着促癌基因或者抑癌基因的作用,在肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭转移、干性等肿瘤恶性生物学行为中发挥截然不同的作用^[3-4],miRNA 常作为肿瘤早期诊断、判断预后的生物标志物,同时也为肿瘤的治疗提供方向^[5]。近来研究发现 miR-335-5p 在不同肿瘤中发挥不同的作用,在胃癌、乳腺癌、膀胱癌等肿瘤中 miR-335-5p 的表达下调,而在结肠癌中 miR-335-5p 呈高表达现象。miR-335-5p 在脑膜瘤、结肠癌^[6]中能够促进细胞增殖,而在肾透明细胞癌^[7]、神经胶质瘤、人间充质干细胞中却能抑制细胞增殖,说明在不同肿瘤中,miR-335-5p 对细胞增殖的调控也是截然不同的。在胃癌中,miR-335-5p 对于细胞增殖的调控作用及机制尚不明确,本研究拟探讨 miR-335-5p 对胃癌细胞增殖的影响,并探讨其潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

各胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、MKN28、MKN-45 与正常胃上皮黏膜细胞系 GES-1 均来源于中科院上海细胞库。RPMI1640 培养基(Gibco,美国)、DMEM 培养基(Hyclone,美国),胎牛血清(Gibco,美国),青链霉素(碧云天公司,上海)。RNA 抽提试剂 Trizol、逆转录试剂盒、SYBR Green PCR

Master Mix (Takara, 日本),二甲基亚砷(DMSO)(Sigma,美国)。过表达慢病毒载体系统(包括 pHBLV-CMV 载体、质粒)、封闭慢病毒载体及 Oct4 双荧光素酶质粒均由上海汉恒生物公司提供。CCK-8 试剂盒购于日本 Dojindo 公司。结晶紫染色液、蛋白提取试剂盒、双荧光素酶报告实验试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒和 ECL 发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;鼠抗人 Oct4、AKT、pAKT 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase,HRP)标记的山羊抗鼠 IgG 抗体、兔抗人 GAPDH 多克隆 IgG 抗体购自沈阳万类生物公司。EdU 试剂盒购于广州锐博生物公司。倒置荧光显微镜为日本 olympus 公司产品。荧光定量 PCR 仪、凝胶成像仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 胃癌细胞系 SGC-7901、MKN-28 和 MKN-45 以及人正常胃黏膜永生化上皮细胞系 GES-1 细胞用含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基于 37 ℃、5%CO₂ 孵箱中培养, BGC-823 细胞采用含 10% 高糖的 DMEM 培养基于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.2.2 慢病毒载体构建及包装 从含有目的基因的质粒上用限制性内切酶 EcoRI 将 miR-335-5p 的序列从载体上约取下来。利用 PCR 扩增体系扩增目的片段后将处理好的目的片段与载体进行连接反应,连接产物转化感受态大肠杆菌菌株 DH5 α ,将得到的克隆产物进行 PCR 和测序鉴定。待细胞达 70%~80%的汇合率时,使用 Lipofiter™ 转染试剂进行转染,转染后 6 h 进行换液,转染后 48 h 和 72 h 分别收集病毒上清,将 50 mL 离心管中的病毒上清,4 ℃,2 000 g,离心 10 min,去除细胞碎片;然后收集病毒原液上清置于超速离心管中,4 ℃,82 700 g,离心 120 min,最后将慢病毒超离液分装到灭菌处理的病毒管中,-80 ℃冰箱保存备用。取 1 管利用逐孔稀释法测定病毒滴度。

1.2.3 细胞转染 取对数生长期 SGC-7901 细胞和 BGC-823 细胞分别接种于 6 孔板中,细胞融合达到 60%后按照推荐 MOI 值分别加入病毒,感染后 12 h 换液,待细胞传代后加入嘌呤霉素筛选稳定转染细胞株,并于倒置荧光显微镜下观察细胞转染情况。实验分组包括:miR-335-5p 过表达慢病毒感染 SGC-7901 细胞(miR-335-5p 组)、空病毒感染 SGC-7901 细胞(阴性对照组,NC)、miR-335-5p 封闭慢病毒感染 BGC-823 细胞(antago-miR-335-5p)、空病毒感染 BGC-823

细胞(阴性对照组,NC)。

1.2.4 qRT-PCR 收集 5×10^6 个细胞,按照 Trizol 试剂盒说明书操作提取总 RNA。细胞总 RNA 采用茎环法逆转录。miRNA 的反转录引物为 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCC-GAGGTGCACTGGATACGACTCAACATC-3'。按照 SYBR Green PCR Master Mix 说明书配置 PCR 反应体系,每组 3 个复孔,并在 Bio-Rad CFX96 仪器上进行扩增反应。扩增条件为:95 ℃ 预变 30 s,95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 30 s,40 个循环。荧光定量 PCR 中 miR-335-5p 的上游引物为 5'-TAGCTTATCA-GACTGA-3',下游引物为 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'。Oct4 的上游引物为 5'-CTTGCTGCAGAACTGGGTGGAG-GAA-3',下游引物为 5'-CTTGCTGCAGAACTGGGTGGAG-GAA-3'。当比较 miR-335-5p 表达量时,U6 设置为内参。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析各组基因的相对表达量。

1.2.5 CCK-8 实验 取转染病毒后的细胞,按照每孔 5×10^3 个细胞加入到 96 孔板中,稀释至每孔 100 μ L,按照实验所设分组,每组设置 3 个复孔。分别培养 24、48、72 h 后,在相同时间点向每个孔中加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂,于 37 ℃ 孵箱中孵育 2 h 后,用酶标仪测量 450 nm 波长下吸光度 (absorbance, A) 值。

1.2.6 平板克隆实验 取转染病毒后的细胞,充分吹散后制成单细胞悬液,按照每孔 500 个细胞加入到 6 孔板中,置于孵箱中孵育约 2 周,每 3 天更换条件培养基。当细胞形成肉眼可见的克隆(每个克隆细胞数为 50~150 个)时终止培养,弃去培养基并用 PBS 小心清洗细胞 2 次后加入多聚甲醛固定 20 min,弃去固定液后 PBS 充分清洗,加入适量结晶紫染色液 30 min,流水清洗干燥,比较克隆形成率。

1.2.7 EdU 实验 取转染病毒后的稳定表达细胞,以每孔 10^5 细胞数接种于 48 孔板中,待培养至正常生长阶段,每孔加入 EdU 培养基孵育 2 h,弃培养基后 PBS 清洗细胞 3 次,每次 5 min 后,加入 4%多聚甲醛固定 30 min,甘氨酸于摇床孵育 5 min 后用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,使用 0.5% TritonX-100 破膜 15 min, PBS 同上方法清洗后每孔分别加入 Apollo 染色反应液,避光孵育 30 min 后,加入 Hoechst33342 反应液染核, PBS 清洗后于荧光导致显微镜下观察红色荧光表达情况。

1.2.8 Western blot 根据 RIPA 裂解液说明书提取每组细胞的总蛋白,BCA 法测蛋白浓度。根据蛋白分子量配置 SDS-PAGE 凝胶,取每组蛋白 50 μ g 进行电泳后按照湿转法转到 PVDF 膜,经 5%脱脂牛奶常温封闭 2 h,按照说明书推荐浓度稀释一抗,4 ℃过夜孵育 PDVF 膜。TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,二抗室温孵育 PDVF 膜 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 15 min, ECL 超敏化学发光法进行显影。

1.2.9 双荧光素酶报告实验 取 SGC-7901 过表达 miR-335-5p 细胞及阴性对照细胞细胞,按照每孔 5×10^3 个细胞

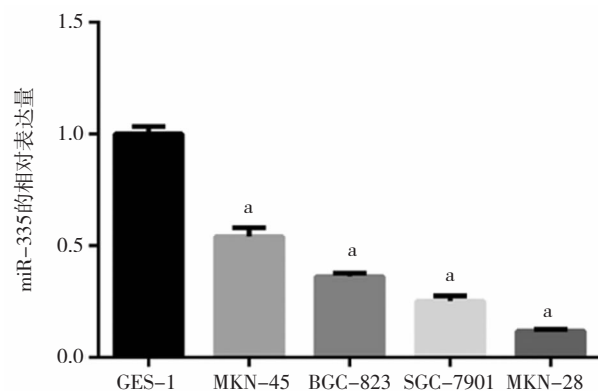
加入到 96 孔板中,分别转染 Oct43' UTR 突变型(MT)和野生型(WT)两种质粒,转染完成后于孵箱中孵育。利用报告基因细胞裂解液充分裂解细胞后,10 000 g 离心 5 min,取上清加入萤火虫荧光素检测液 100 μ L 检测荧光强度。设定检测间隔为 2 s,检测时间为 10 s。检测完毕后继续加入 100 μ L 海肾荧光素检测液检测海肾荧光强度。同时测定报告基因裂解液为空白对照,取海肾荧光强度为内参进行统计。

1.3 统计学方法

所有数据用 SPSS 20.0 软件分析数据结果采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,2 组间比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-335-5p 在胃癌细胞系和胃黏膜上皮细胞中的表达 胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、MKN-28、MKN-45 细胞系中 miR-335-5p 的表达水平低于胃黏膜上皮细胞系 GES-1 ($F=496.500, P=0.000$, 图 1)。



a: 与人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 相比, $P < 0.05$

图 1 Real-time PCR 检测胃癌细胞系及胃黏膜上皮细胞系 miR-335-5p 表达水平

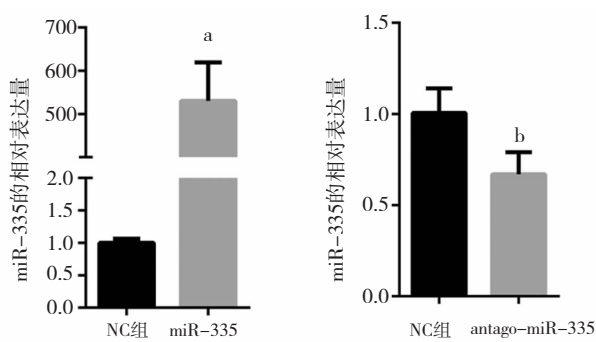
2.2 荧光定量 PCR 验证转染效果

为确定 miR-335-5p 过表达病毒以及封闭慢病毒是否分别成功转染 SGC-7901 和 BGC-823 细胞株,分别提取稳定转染病毒细胞株的 RNA,用实时荧光定量 PCR 检测 miR-335-5p 的表达,发现转染过表达病毒组 miR-335-5p 的表达量 (530.346 ± 88.942) 较空病毒阴性对照组 (1.001 ± 0.063) 明显升高 ($t=10.310, P=0.000$),转染封闭慢病毒组中 miR-335-5p 的表达量 (0.669 ± 0.121) 较空病毒阴性对照组 (1.007 ± 0.135) 明显下降 ($t=3.225, P=0.032$),如图 2 所示。

2.3 miR-335-5p 对胃癌细胞增殖能力的影响

CCK-8 实验结果显示与阴性对照组相比,miR-335-5p 组细胞生长速度明显减慢,antago-miR-335-5p 组细胞速度明显加快。

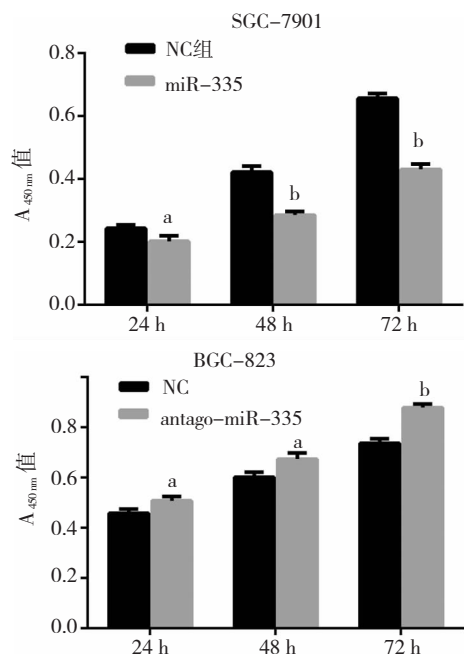
在第 1 天,miR-335-5p 组的 $A_{450\text{ nm}}$ 值(0.202 ± 0.018)较其阴性对照组(0.244 ± 0.011)有所降低($t=3.351, P=0.028$),封闭慢病毒组的 $A_{450\text{ nm}}$ 值(0.507 ± 0.017)较阴性对照组(0.458 ± 0.016)明显升高($t=3.687, P=0.021$)。在第 2 天,miR-335-5p 组的 $A_{450\text{ nm}}$ 值(0.286 ± 0.012)较其阴性对照组(0.422 ± 0.019)有所降低($t=10.390, P=0.000$),封闭慢病毒组的 $A_{450\text{ nm}}$ 值(0.673 ± 0.025)较阴性对照组(0.602 ± 0.020)明显升高($t=3.821, P=0.019$)。在第 3 天,miR-335-5p 组的 $A_{450\text{ nm}}$ 值(0.431 ± 0.017)较其阴性对照组(0.657 ± 0.015)有所降低($t=17.390, P=0.000$),封闭慢病毒组的 $A_{450\text{ nm}}$ 值(0.878 ± 0.014)较阴性对照组(0.735 ± 0.019)明显升高($t=10.210, P=0.000$),如图 3 所示。



a: 在 SGC-7901 细胞系中,与 NC 组相比, $P=0.000$;

b: 在 BGC-823 细胞系中,与 NC 组相比, $P=0.032$

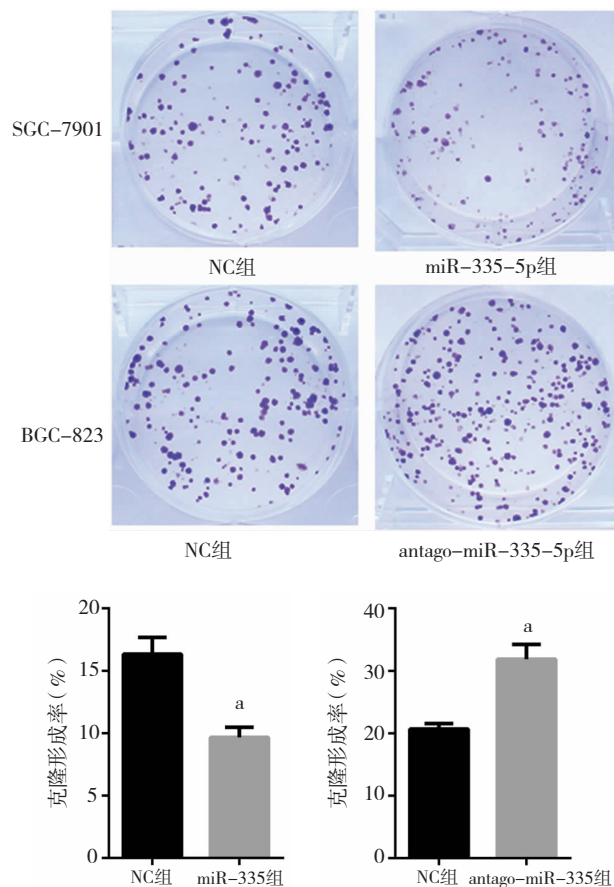
图 2 Real-time PCR 检测转染病毒后 miR-335-5p 的表达水平



a: 与 NC 组相比, $P<0.05$;b: 与 NC 组相比, $P=0.000$

图 3 CCK-8 检测过表达 miR-335-5p 和封闭 miR-335-5p 对细胞增殖能力的影响

平板克隆实验证实,与阴性对照组[(9.7 ± 0.8)%]比较,过表达 miR-335-5p 组中克隆形成率[(16.3 ± 1.3)%]明显下降($t=7.412, P=0.002$);封闭 miR-335-5p 组克隆形成率[(31.9 ± 2.3)%]较阴性对照组[(20.7 ± 0.9)%]明显升高($t=7.725, P=0.002$),如图 4 所示。



a: 与 NC 组相比, $P=0.020$

图 4 平板克隆检测过表达 miR-335-5p 和封闭 miR-335-5p 对细胞增殖能力的影响

EdU 实验表明过表达 miR-335-5p 组中 EdU 阳性细胞率[(35.4 ± 2.7)%]明显低于阴性对照组[(46.1 ± 1.5)%]($t=5.922, P=0.004$);封闭 miR-335-5p 组 EdU 阳性细胞率[(70.7 ± 4.4)%]明显高于阴性对照组[(58.1 ± 1.9)%]($t=4.558, P=0.010$),如图 5 所示。

2.4 miR-335-5p 对 Oct4、AKT、pAKT 表达的影响

为探究 miR-335-5p 调控胃癌细胞增殖能力的机制,通过查询 TargetScan、miRase 等数据库,发现 Oct4 是 miR-335-5p 的一个相对高度保守的靶基因,本课题组猜测 miR-335-5p 可能通过靶向结合 Oct4 来调控胃癌细胞的增殖能力。通过 Western blot 检验 Oct4 的蛋白表达水平,证实过表达 miR-335-5p 组中 Oct4 的表达量(0.469 ± 0.054)明显低于阴性对照组(0.670 ± 0.045)($t=4.989, P=0.008$),而封闭 miR-335-5p 组 Oct4 的表达(0.804 ± 0.046)高于阴性对照组($0.600 \pm$

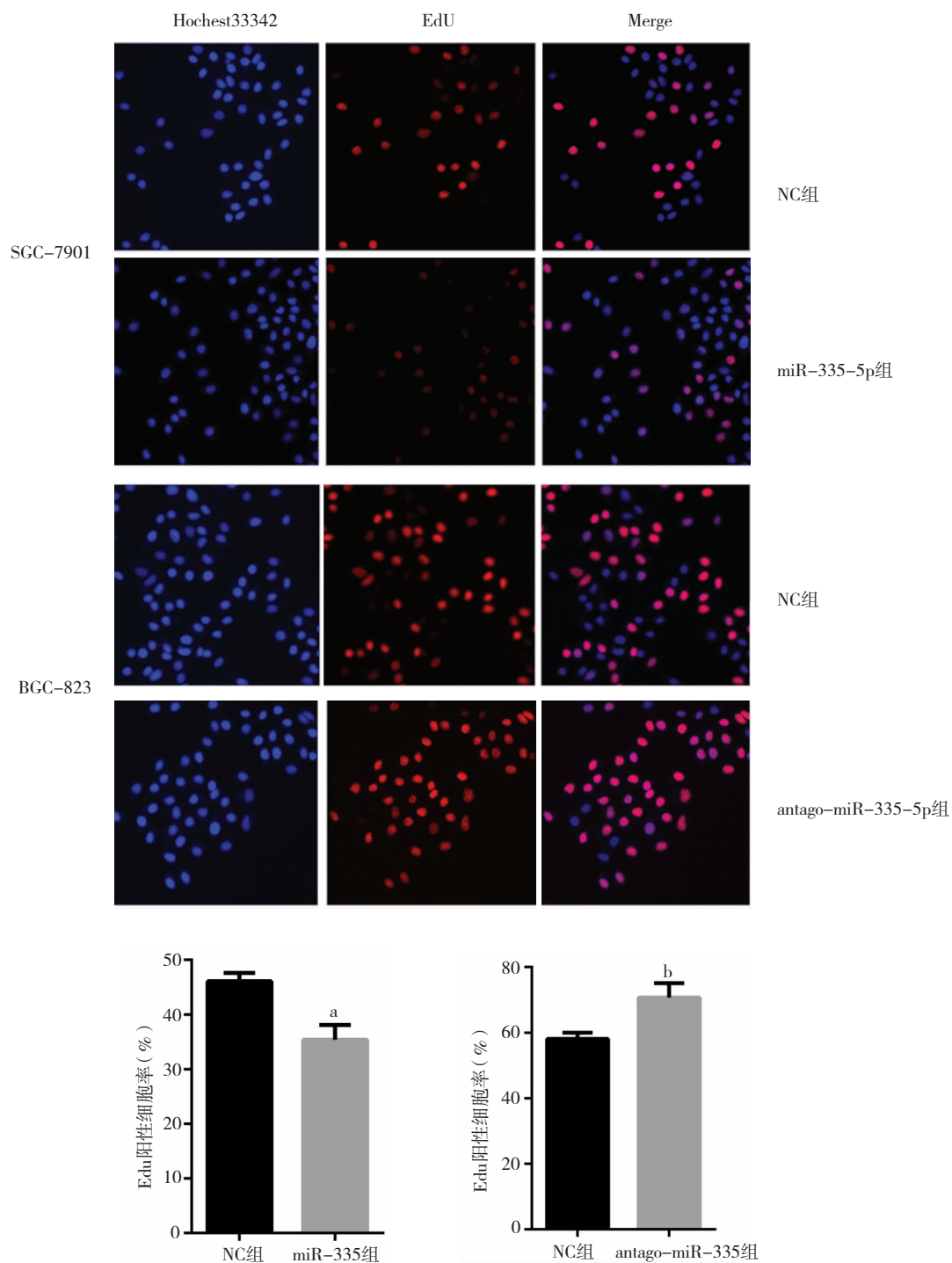


图 5 EdU 检测过表达 miR-335-5p-5p 和封闭 miR-335-5p-5p 对细胞增殖能力的影响

0.073)($t=4.117, P=0.015$), 如图 6 所示。通过双荧光素酶报告实验, 发现在转染 Oct4 的 3'UTR 野生型质粒组(WT)中, 过表达 miR-335-5p 组的荧光强度(1.698 ± 0.138)明显低于阴性对照组(2.465 ± 0.222)($t=5.869, P=0.001$), 而在转染 Oct4 的 3'UTR 突变型(MT)中, 过表达 miR-335-5p 组的荧光强度(2.326 ± 0.231)与阴性对照组(2.441 ± 0.329)无明显差异

($t=0.5724, P=0.588$), 如图 7 所示。

用 Western blot 检测 AKT 以及 pAKT 的表达水平表明, 过表达 miR-335-5p 组中 pAKT 的表达量(0.525 ± 0.046)较阴性对照组(0.847 ± 0.053)有所下降($t=7.942, P=0.001$), 而封闭 miR-335-5p 组(0.841 ± 0.069)中 pAKT 的表达量较阴性对照组(0.563 ± 0.063)有所上升($t=5.148, P=0.007$)(图 6)。

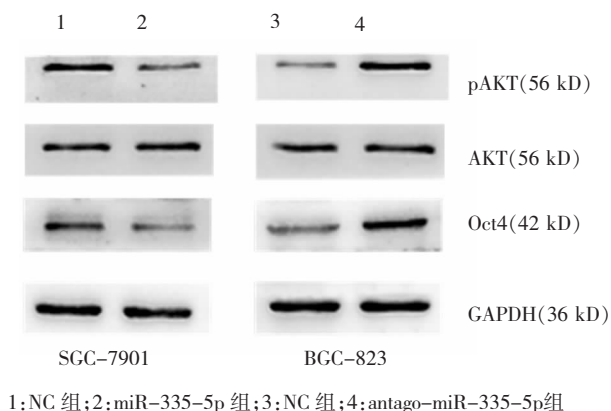


图6 Western blot 检测 Oct4、AKT 和 pAKT 的表达

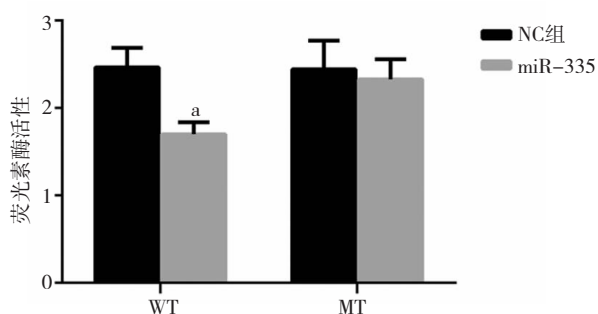
a: 与 NC 组相比, $P=0.001$

图7 双荧光素酶报告实验检测 miR-335-5p 与 Oct4 的靶向关系

3 讨论

miRNA是存在于真核生物中的一类高度保守的非编码RNA,其对靶基因的调控作用主要是与其mRNA的3'UTRs结合,从而抑制靶基因的表达。miRNA主要是通过抑制促癌基因或者抑癌基因的表达,达到对肿瘤细胞增殖、侵袭、凋亡等恶性生物学行为的影响。miR-335-5p在肾透明细胞癌和结肠癌中对细胞增殖截然相反的调控作用,说明miR-335-5p在不同肿瘤存在异质性,发挥着截然不同的作用。

本研究中,首先通过荧光定量PCR检测了胃癌细胞株中miR-335-5p的表达并发现胃癌细胞株中miR-335-5p的表达较正常胃黏膜上皮细胞系中miR-335-5p的表达有所下降,这与Sandoval-Bórquez等^[8]的研究一致。为研究miR-335-5p对胃癌细胞增殖的调控作用,课题组利用慢病毒载体感染胃癌细胞株,成功构建过表达miR-335-5p的SGC-7901细胞株及封闭miR-335-5p的BGC-823细胞

株,CCK-8实验、平板克隆实验和EdU实验表明,miR-335-5p能够抑制胃癌细胞的增殖。这与在肾透明细胞癌、神经胶质瘤中的报道一致,而在结肠癌、脑膜瘤中的报道是相反的。猜测在不同肿瘤中,miR-335-5p能够调控不同的靶基因,从而激活不同的信号通路导致肿瘤细胞相应的生物学行为发生截然不同的变化。通过生物信息学软件,预测Oct4是miR-335-5p的一个高度保守靶基因。Oct4是POU转录因子家族中的一员,POU家族是DNA结合蛋白,能够结合目的基因八聚体亚序,调控目的基因的表达。Oct4最早被发现为与Klf4、Nanog、Sox2作为维持干细胞多潜能、自我更新和分化的重要因子^[9]。近来,越来越多的研究表明Oct4不仅仅与干细胞相关,在肿瘤的发生发展起着也起着重要作用。在前列腺癌中,Oct4的表达与肿瘤更高的T分期相关^[10];在乳腺癌中,Oct4的高表达与淋巴血管侵犯相关^[11]。课题组前期研究也表明Oct4的高表达在胃癌中提示着不良的预后,说明Oct4在胃癌中可能起着促癌基因的作用^[12]。同时,课题组发现在口腔鳞状细胞癌中,Oct4能够促进肿瘤的增殖^[13]。推测miR-335-5p通过靶向Oct4抑制了胃癌细胞的增殖行为。通过Western blot检测过表达miR-335-5p细胞株,Oct4的蛋白表达水平均有下降而在封闭miR-335-5p的细胞株中,Oct4的蛋白表达水平有所上升,说明miR-335-5p靶向Oct4,抑制其蛋白表达,同时课题组通过双荧光素酶报告实验证实miR-335-5p能够靶向Oct4。这与在膀胱癌^[14]及骨肉瘤^[15]中的发现是一致的。

在胚胎肿瘤细胞中,敲低Oct4的表达增加了AKT1的mRNA、pAKT-T308和pAKT-S473水平^[16]。在恶性胶质瘤中,抑制PI3K-AKT的活化能够增加OCT4的表达^[17],说明AKT与Oct4之间可能存在着相互负反馈调节。同时有文献报道,抑制Oct4和AKT通路的抑制剂对肿瘤细胞的增殖较单独抑制更好^[18],认为在Oct4和AKT中都存在着大量的下游靶基因,单独的活化可能导致一些配对物的失活。然而在膀胱癌中抑制Oct4能够通过Akt通路抑制肿瘤细胞增殖^[19];在肝癌中过表达Oct4能够诱导AKT磷酸化^[20],说明在实体肿瘤中,Oct4可能是通过诱导AKT的磷酸化而起作用的。在胃癌细胞中,课题组通过检测过表达miR-335-5p的细胞株,发现pAKT的表达下调,而封闭miR-335-5p的细

胞株 pAKT 表达上调,说明 Oct4 和 pAKT 的表达呈正相关,miR-335-5p 可能通过靶向 Oct4 去抑制 AKT 的磷酸化从而抑制肿瘤细胞增殖,证实了在实体肿瘤中 Oct4 与 pAKT 之间的正相关调控关系。

综上所述,本课题组利用构建过表达及封闭 miR-335-5p 的胃癌细胞系,证明了 miR-335-5p 可以抑制胃癌细胞的增殖,Oct4 是 miR-335-5p 的一个靶基因,miR-335-5p 可能通过靶向 Oct4 抑制 AKT 通路从而肿瘤细胞的增殖。

参 考 文 献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistic, 2012[J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] He L, Hannon GJ. MicroRNAs; small RNAs with a big role in gene regulation[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2004, 5(7): 522-531.
- [3] Yao YL, Ma J, Wang P, et al. miR-101 acts as a tumor suppressor by targeting kruppel-like factor 6 in glioblastoma stem cells[J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2015, 21(1): 40-51.
- [4] Kaid C, Silva PBG, Cortez BA, et al. miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells[J]. *Cancer Science*, 2015, 106(9): 1188-1195.
- [5] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017, 16(3): 203-222.
- [6] Lu Y, Yang H, Li Y, et al. Overexpression of miR-335-5p confers cell proliferation and tumour growth to colorectal carcinoma cells[J]. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 2015, 412(1-2): 235-245.
- [7] Wang K, Chen X, Zhan Y, et al. miR-335-5p inhibits the proliferation and invasion of clear cell renal cell carcinoma cells through direct suppression of BCL-W[J]. *Tumor Biology*, 2015, 36(9): 6875-6882.
- [8] Sandoval-Bórquez A, Polakovicova I, Carrasco-Véliz N, et al. MicroRNA-335-5p is a potential suppressor of metastasis and invasion in gastric cancer[J]. *Clinical Epigenetics*, 2017, 9(1): 114.
- [9] Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4[J]. *Cell*, 1998, 95(3): 379-391.
- [10] Kosaka T, Mikami S, Yoshimine S, et al. The prognostic significance of OCT4 expression in patients with prostate cancer[J]. *Human Pathology*, 2016, 51: 1-8.
- [11] Liu T, Sun B, Zhao X, et al. OCT4 expression and vasculogenic mimicry formation positively correlate with poor prognosis in human breast cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(11): 19634-19649.
- [12] Kong D, Su G, Zha L, et al. Coexpression of HMGA2 and Oct4 predicts an unfavorable prognosis in human gastric cancer[J]. *Medical Oncology*, 2014, 31(8): 130.
- [13] Li C, Yan Y, Ji W, et al. OCT4 positively regulates survivin expression to promote cancer cell proliferation and leads to poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49693.
- [14] Gao L, Yang Y, Xu H, et al. MiR-335-5p functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting OCT4[J]. *Tumor Biology*, 2014, 35(8): 8309-8318.
- [15] Guo X, Ling Y, Zhang Z, et al. miR-335-5p negatively regulates osteosarcoma stem cell-like properties by targeting POU5F1[J]. *Cancer Cell International*, 2017, 17(1): 29.
- [16] Lin Y, Yang Y, Li W, et al. Reciprocal regulation of Akt and Oct4 promotes the self-renewal and survival of embryonal carcinoma cells[J]. *Molecular Cell*, 2012, 48(4): 627-640.
- [17] Jones NM, Rowe MR, Shepherd PR, et al. Targeted inhibition of dominant PI3-kinase catalytic isoforms increase expression of stem cell genes in glioblastoma cancer stem cell models[J]. *International Journal of Oncology*, 2016, 49(1): 207-216.
- [18] Li W, Zhou Y, Zhang X, et al. Dual inhibiting OCT4 and AKT potently suppresses the propagation of human cancer cells[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 46246.
- [19] Lin H, Sun LH, Han W, et al. Knockdown of OCT4 suppresses the growth and invasion of pancreatic cancer cells through inhibition of the AKT pathway[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 10(3): 1335-1342.
- [20] Wang XQ, Ongkeko WM, Chen L, et al. Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP-binding cassette G2 pathway[J]. *Hepatology*, 2010, 52(2): 528-539.

(责任编辑:冉明会)