doi:10.11659/jjssx.06E021132

·基础研究·

miR-3607 在胃癌中的表达及其与预后的相关性研究

张乙川[1],李 玲[1],杨成俊[2],王 飞[2],刘珂良[1] (1.攀枝花学院附属医院消化疾病中心微创内镜中心,四川 攀枝花 617000;2.攀枝花学院附属医院消化疾病中心消化内科,四川 攀枝花 617000)

[摘 要] **目的** 探讨 miR-3607 异常表达在胃癌细胞增殖、迁移和侵袭中的作用及其与患者预后的相关性。**方法** 选择我院行胃癌切除术的患者 117 例,经手术切除获取胃癌组织和相邻正常组织(癌旁组织)。将 miR-3607 mimic、miR-3607 inhibitor、mimic NC、inhibitor NC 转染至 HGC-27 和 MKN45 细胞内(未处理细胞为 Control)。采用实时定量 PCR 技术检测 miR-3607 的表达情况。CCK-8 法检测胃癌细胞增殖情况。用 Transwell 法检测胃癌细胞的侵袭和迁移能力。采用 *Kaplan-Meier* 曲线和 *Cox* 回归分析探讨 miR-3607 的表达水平在胃癌中的预后意义。**结果** miR-3607 在胃癌组织和胃癌细胞系中表达明显下调。miR-3607 低表达可促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭。*Kaplan-Meier* 曲线显示,miR-3607 低表达组患者总生存率显著低于高表达组。*Cox* 回归分析结果显示,miR-3607 低表达、淋巴结转移、TNMⅢ期与胃癌患者的总生存率具有相关性。**结论** miR-3607 的异常低表达会促进胃癌的进展,并且通常提示患者的不良预后,miR-3607 可能是胃癌的一个预后标志物和胃癌靶点治疗新策略。

[关键词] miR-3607;胃癌;预后;胃癌切除术

[中图分类号] R735.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-06-28

Expression of miR-3607 in gastric cancer and its correlation with prognosis

ZHANG Yi-chuan[1], LI Ling[1], YANG Cheng-jun[2], WANG Fei[2], LIU Ke-liang[1] (1. Minimally Invasive Endoscopy Center, Digestive Disease Center, Affiliated Hospital of Panzhihua University, Panzhihua Sichuan 617000, China; 2. Department of Gastroenterology, Digestive Disease Center, Affiliated Hospital of Panzhihua University, Panzhihua Sichuan 617000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of abnormal expression of miR-3607 on the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells and its correlation with the prognosis of patients. **Methods** A total of 117 patients who underwent gastric cancer resection in our hospital were selected, and the gastric cancer tissues and adjacent normal tissues (para-cancer tissues) were obtained after surgical resection. MiR-3607 mimic, miR-3607 inhibitor, mimic NC, inhibitor NC were transfected into the HGC-27 and MKN45 cells (the untreated cells were Control). The real-time quantitative PCR technology was used to detect the expression of miR-3607. CCK-8 method was used to detect the proliferation of gastric cancer cells. Transwell assay was used to detect the invasion and migration ability of gastric cancer cells. The *Kaplan-Meier* curve and *Cox* regression analysis were used to explore the prognostic significance of the expression level of miR-3607 in gastric cancer. **Results** The expression of miR-3607 was significantly down-regulated in gastric cancer tissues and gastric cancer cell lines. The low expression of miR-3607 can promote the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells. The *Kaplan-Meier* curve showed that the overall survival rate of patients in the low-expression group of miR-3607 was significantly lower than that in the high-expression group. The results of *Cox* regression analysis showed that the low expression of miR-3607, lymph node metastasis, and TNM stage Ⅲ had correlation with the overall survival rate of gastric cancer patients. **Conclusion** The abnormally low expression of miR-3607 can promote the progression of gastric cancer and generally indicates a poor prognosis for patients, which may be a prognostic marker of gastric cancer and a new therapeutic strategy for targeted treatment of gastric cancer.

Keywords: miR-3607; gastric cancer; prognosis; gastric cancer resection

胃癌是常见的恶性肿瘤之一,多数患者在初次就诊时已为中晚期,导致其生存率较低[1-2]。因此有必要进一步阐明胃癌发生和发展的分子生物学机制,寻找有效的分子标记物,这将有助于胃癌的早期诊断,从而提高患者生存率,改善不良预后[3]。microRNA(miRNA)是一类内源性非编码小分子单链RNA,主要由单链 RNA 前体加工产生,长度一般为 19 ~ 24 nt[4-5]。miRNA 可影响细胞的增殖、分化、迁移、侵袭和凋亡,并参与各种疾病和肿瘤的生物学过程,探索 miRNA 的表达和相应的信号通路将为肿瘤的治疗提供新的药物靶点[6]。近年来,越来越多的学者致力于研究 miR-3607 的表达与肿瘤的关系,Liu 等[7]使用 miRCURY array LNA miRNA芯片评估在胃癌组织和正常组织之间的异常 miRNA 表达谱,其中 miR-3607 在

[通信作者] 李 玲,E-mail:tyxsli000256@163.com

胃癌组织中为异常低表达,故 miR-3607 在胃癌中可能参与胃癌的发生发展,但其在胃癌中的临床和功能性作用鲜有报道。因此,深入了解 miR-3607 在胃癌中的临床意义和潜在作用机制对于寻找新的胃癌生物标志物及潜在治疗靶点具有重要的价值。本研究通过检测 miR-3607 在胃癌组织和细胞中的表达水平,初步探讨了 miR-3607 在胃癌细胞增殖、迁移和侵袭中的作用,分析了其在胃癌预后评估中的价值,旨在为临床胃癌患者的治疗提供新的分子靶点和治疗策略。

1 材料与方法

1.1 患者和组织样本

选取 2013 ~2015 年在攀枝花学院附属医院进行胃癌切除术的 117 例患者。经手术切除分别获得直径为 0.5 cm 的胃癌组织和 4 cm 的相邻正常组织(癌旁组织)样本。新鲜样本立即于液氮中冷冻,于 -80 ℃保存备用。所有胃癌样本均经病理确诊。参与试验的所有患者术前均签署知情同意书。本研究获得攀枝花学院附属医院医学伦理委员会批准(201311001)。

1.2 细胞培养和转染

胃癌细胞系(HGC-27、NCI-N87、AGS、MKN45)和正常上皮细胞系(GES-1)均购自中国科学院细胞库(中国上海)。所有细胞均在 37 ℃、5% CO_2 环境下,含 10% 胎牛血清(FBS,GIBCO)的 RPMI-1640 培养基(Hyclone)中培养。待细胞生长到 50% ~80% 时,按照 Lipofectamine 3000 试剂说明书转染细胞(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 美国),将 miR-3607 mimic、miR-3607 inhibitor、mimic NC、inhibitor NC 转染至 HGC-27 和 MKN45 细胞内(未处理细胞为 Control)用于后续实验。

1.3 总 RNA 提取和实时定量 PCR(qRT-PCR)分析

采用 Trizol 法提取总 RNA(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific,Waltham,美国)。NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific,Waltham,美国)用来定量 RNA。严格按照 PrimeScript RT 试剂盒(Takara, Otsu,Japan)说明书进行逆转录。在 ABI 7500 PCR 系统上,按照 SYBR-Green I Master 混合试剂盒的说明书进行 qRT-PCR(Thermo Fisher Scientific, Waltham, 美国)分析。反应条件:94 ℃变性10 min,接着 35 个循环 94 ℃,30 s;58 ℃,30 s;72 ℃,30 s。PCR 引物序列:miR-3607 上游 5'-GGGACTGTAAACGCTT-3',下游 5'-CTCAACTGGTGTCGTGGA-3';U6 上游 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',下游 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 miR-3607的相对表达水平并将其归一到内参基因 U6。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖能力

在 96 孔板上进行细胞增殖实验,每孔2×10^3个细胞。孔中加入 10 μL CCK-8 溶液(Dojindo, Kumamoto, 日本),于 37 ℃、5% CO_2环境下培养 2 h,450 nm处测量其吸光度,实验平行重复 3 次。

1.5 Transwell 法检测细胞迁移及侵袭能力

利用 Transwell 实验检测细胞的侵袭和迁移能力。在进行细胞侵袭实验之前,基质被预涂到 Transwell 的上腔室中,然后在上腔室加入 100 μL 无血清培养基配制细胞悬浮液,下室加入 500 μL 含 10% 胎牛血清的培养液,培养 24 h 后,固定 30 min 并用 0.1% 结晶紫染色 20 min。在光学显微镜下观察细胞数并计数。迁移实验 Transwell 上腔室不需要预涂基质,其他步骤与侵袭实验相同。

1.6 胃癌患者临床病历资料收集和预后分析

根据电子病历收集并记录所有患者的临床资料,主要包括年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移、TNM 分期。根据胃癌患者组织中 miR-3607 的平均表达值,将患者分为低表达组和高表达组。术后 2 年内每 3 个月随访 1 次,随后每 6 个月随访 1 次,最后 1 年随访 1 次,收集患者 5 年总生存随访记录。结合 miR-3607 在组织中的表达水平和总生存率,使用 *Kaplan-Meier* 和多因素 *Cox* 回归分析评估 miR-3607 在胃癌中的预后价值。

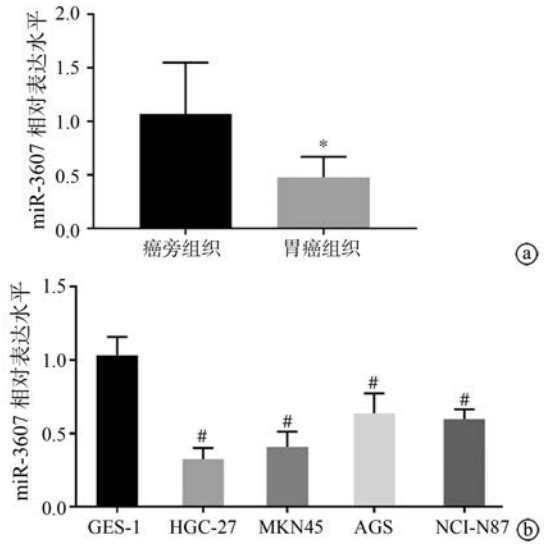
1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。2 组间均数比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 *one-way ANOVA* 分析。采用 *Kaplan-Meier* 绘制患者的总体生存曲线,*Cox* 比例风险回归模型进行多因素分析。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织和胃癌细胞系中 miR-3607 表达水平

qRT-PCR 检测结果显示,与癌旁组织相比,miR-3607在胃癌组织中的表达显著下调($P<0.05$),见图 1a。与正常上皮细胞系 GES-1 相比,胃癌细胞系 HGC-27、NCI-N87、AGS、MKN45 中 miR-3607 的表达水平较低($P<0.001$),见图 1b。



a:胃癌组织和癌旁组织中 miR-3607 的表达;b:胃癌细胞系中 miR-3607 的表达 *:与癌旁组织比较,$P<0.05$;#:与 GES-1 比较,$P<0.001$

图 1 miR-3607 在胃癌组织和细胞系中的表达情况

2.2 miR-3607 下调促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭

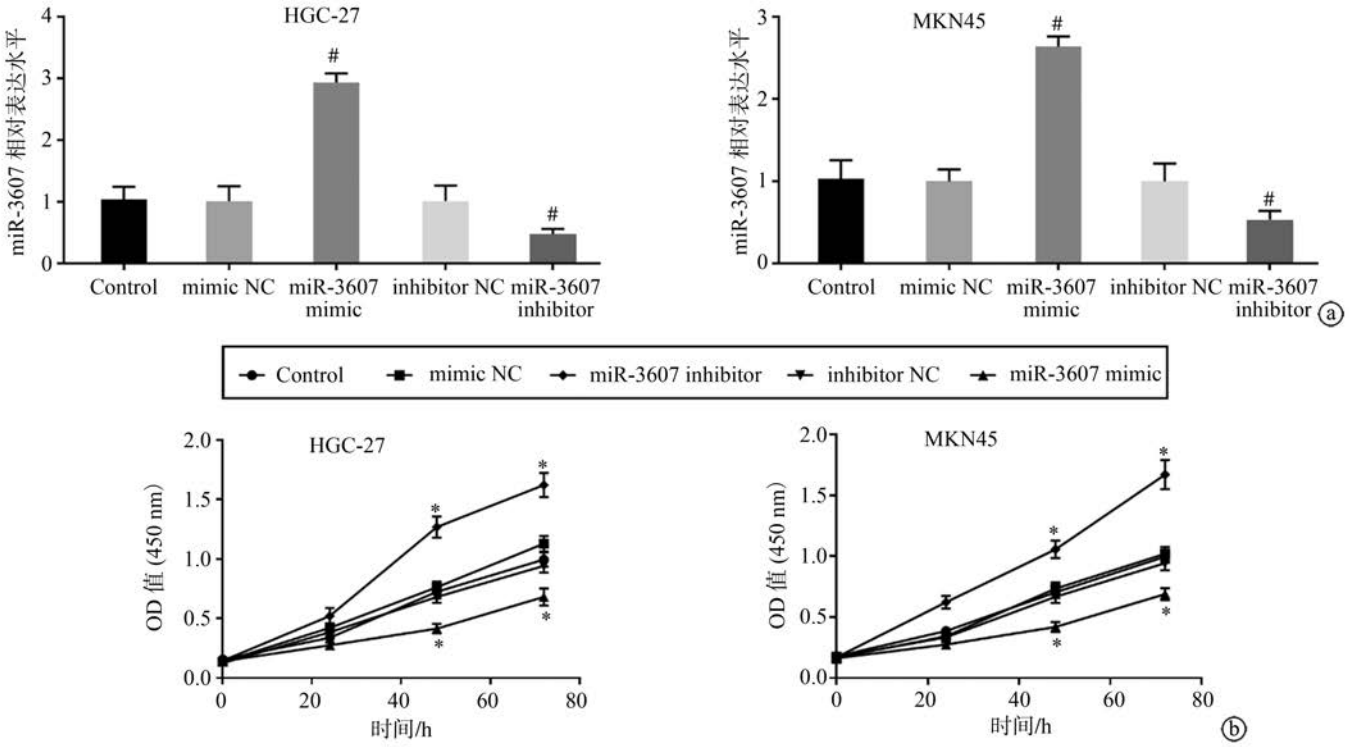
qRT-PCR 结果显示,与 Control 相比,miR-3607 mimic 中 miR-3607 的表达显著增加,而 miR-3607 inhibitor中miR-3607的表达降低($P<0.001$),见图 2a。CCK-8 法检测结果显示,与 Control 相比,miR-3607 的低表达可以促进胃癌细胞的增殖,而高表达的miR-3607可以抑制胃癌细胞的增殖($P<0.05$),见图 2b。Transwell 法检测 HGC-27 和 MKN45 细胞的迁移和侵袭能力,结果显示,与 Control 相比,miR-3607 的低表达显著增强了胃癌细胞的迁移和侵袭能力($P<0.05$),见图 3。

2.3 胃癌患者临床特征与 miR-3607 表达的关系

根据 miR-3607 表达的平均值将患者分为低表达组($n=60$)和高表达组($n=57$)。经分析发现,miR-3607的表达与淋巴结转移($P=0.037$)和 TNM 分期($P=0.032$)相关,而与患者的年龄、性别、肿瘤大小和分化程度无关($P>0.05$),见表 1。

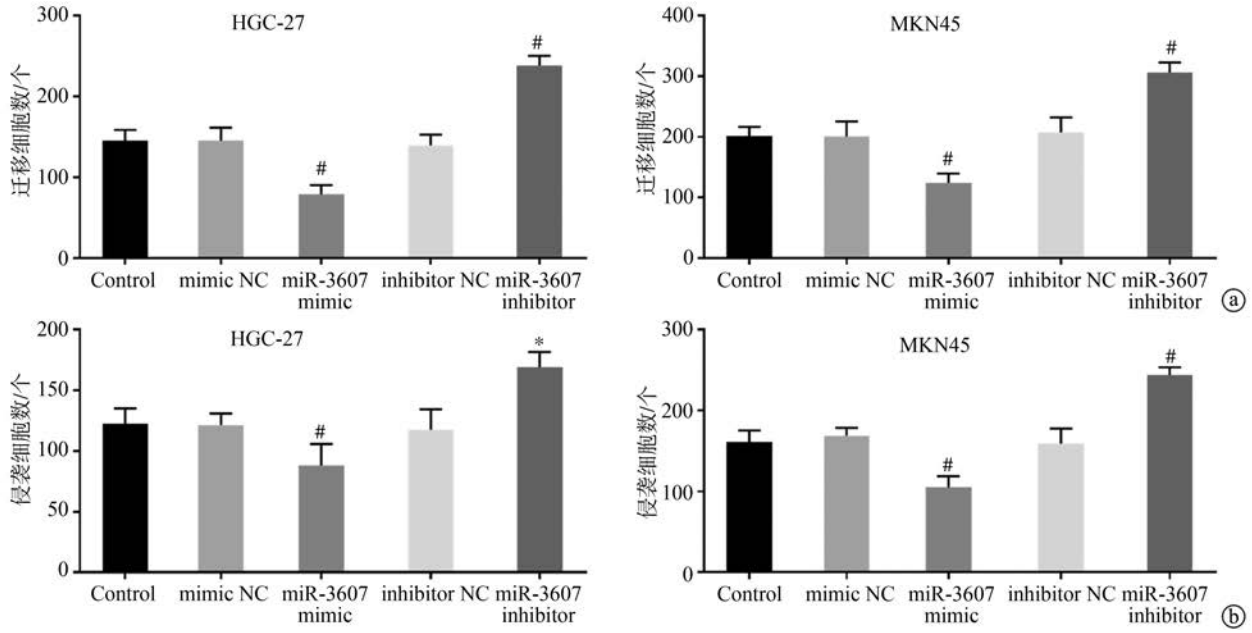
2.4 miR-3607 表达下调与胃癌患者预后不良的相关性

通过 *Kaplan-Meier* 生存曲线分析 miR-3607 表达水平与胃癌患者总生存率之间的关系,结果表明,miR-3607低表达组患者的总生存率明显低于高表达组(图 4)。*Cox* 回归分析结果显示,miR-3607 低表达、淋巴结转移、TNM Ⅲ期与胃癌患者的总生存率相关(表 2),可以作为胃癌的独立预后因素。



a:qRT-PCR 检测 miR-3607 在 HGC-27 和 MKN45 细胞中的表达水平;b:CCK-8 法检测细胞增殖 #:与 Control 比较,$P<0.001$;*:与 Control比较,$P<0.05$

图 2 miR-3607 表达水平对 HGC-27 和 MKN45 胃癌细胞系增殖的影响



a:细胞迁移能力;b:细胞侵袭能力 #:与 Control 比较,$P<0.001$;*:与 Control 比较,$P<0.05$

图 3 Transwell 法测定 miR-3607 对 HGC-27 和 MKN45 细胞迁移和侵袭能力的影响

表 1 miR-3607 表达与胃癌患者临床特征的相关性(例)

临床特征		高表达组($n=57$)	低表达组($n=60$)	P
年龄	<60 岁	37	32	0.203
	≥60 岁	20	28	
性别	男	36	38	0.984
	女	21	22	
肿瘤大小	<2 cm	32	28	0.305
	≥2 cm	25	32	
分化程度	高/中分化	34	28	0.160
	低分化	23	32	
淋巴结转移	未转移	46	38	0.037
	转移	11	22	
TNM 分期	Ⅰ~Ⅱ期	43	34	0.032
	Ⅲ期	14	26	

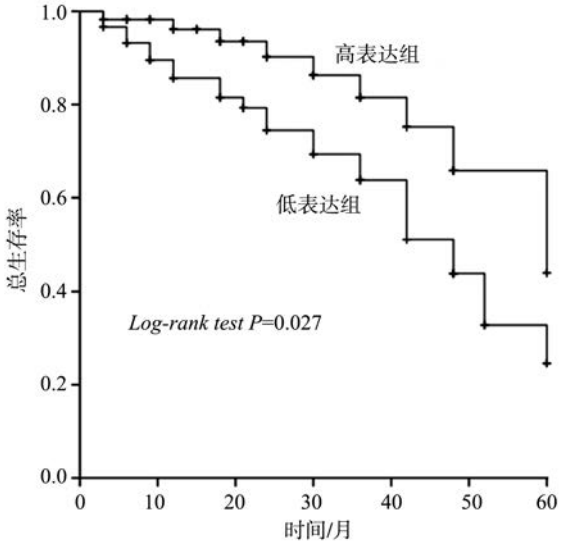


图 4 胃癌患者生存时间的 *Kaplan-Meier* 曲线

表 2 多因素 *Cox* 回归分析

变量	*HR*	95% *CI*	*P*
miR-3607(低表达 *vs.* 高表达)	2.867	1.209~6.798	0.017
年龄(<60 岁 *vs.* ≥60 岁)	0.757	0.355~1.615	0.472
性别(男 *vs.* 女)	1.458	0.711~2.989	0.303
肿瘤大小(≥2 cm *vs.* <2 cm)	1.340	0.637~2.818	0.441
分化程度(高/中分化 *vs.* 低分化)	0.459	0.207~1.020	0.056
淋巴结转移(转移 *vs.* 未转移)	2.333	1.150~4.733	0.019
TNM 分期(Ⅰ~Ⅱ期 *vs.* Ⅲ期)	0.386	0.166~0.895	0.027

3 讨论

胃癌是世界范围内发病率和病死率均较高的恶性肿瘤,近年来引起了人们的广泛关注[8-9]。胃癌的发病机制复杂多样,涉及许多生物遗传和表观遗传学变化[10-11]。目前,越来越多的证据表明,miRNAs 在多种人类癌症的发病机制中起着关键作用[12-14]。这些小的非编码 RNA 具有调控基因表达的能力,通常参与多种生物过程中的关键过程,如癌变。有证据表明,miRNA可以影响胃癌细胞的增殖、分化、凋亡,并参与胃癌的病理过程[15-16]。因此,miRNA 在胃癌的诊断及预后评估等方面具有重要的作用。

miR-3607 的异常表达与多种癌症的进展密切相关。有研究显示,miR-3607 通过靶向 TGFBR1 和 CCNE2抑制非小细胞肺癌细胞的生长和转移,其在非小细胞肺癌组织中表达下调,并与患者预后相关,可以作为非小细胞肺癌的潜在非侵入性生物标志物[17]。然而 miR-3607 的表达在胃癌中发挥的作用尚不清楚。

本研究结果显示,miR-3607 在胃癌组织中的表达水平显著低于癌旁组织,且在胃癌细胞系中表达下调;此外,miR-3607 低表达的患者多数表现为 TNM 晚期和淋巴结转移。且有研究表明,miR-3607 在肝癌和结直肠癌中同样表现为低表达并参与肿瘤进展[18-19]。说明 miR-3607 的下调同样可能参与了胃癌的进展。

由于 miR-3607 在胃癌组织和高侵袭细胞系中低表达,我们推测 miR-3607 可能在胃癌中发挥抑癌的作用。为了验证这一点,本研究评估了 miR-3607 对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响,结果显示,miR-3607 低表达显著提高了胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,而 miR-3607 高表达则降低了细胞的增殖、迁移和侵袭能力,这提示 miR-3607 高表达可能在胃癌中发挥抑制作用。有研究显示,miR-3607 在肝癌细胞中的表达降低提示不良预后,而其在肝癌细胞中过表达会抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭,这为肝癌的治疗和预后提供了新的方向[18]。本研究进一步研究了 miR-3607 在胃癌中的预后意义,结果显示,miR-3607 低表达的患者预后较差且是独立预后风险因子,表明 miR-3607 可能作为胃癌患者预后不良的潜在预测因子。然而 miR-3607在胃癌中的具体作用机制尚未阐明,其在胃癌中的临床预后价值还需进一步确认,在以后的工作中,我们会对此进行深入研究。

综上所述,miR-3607 在胃癌组织和细胞系中显著下调,并且与患者生存期短有关,是影响胃癌患者预后不良的独立危险因素,其可能成为预测胃癌患者预后不良的生物标志物。此外,miR-3607 高表达可以抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭,表明 miR-3607 有望成为胃癌的潜在治疗靶点。

[参考文献]

[1] 左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等. 中国胃癌流行病学现状[J]. 中国肿瘤临床,2017,(1):52 - 58. doi:10.3969/j.issn.1000 - 8179.2017.01.881.

[2] Johnston FM, Beckman M. Updates on management of gastric cancer [J]. Curr Oncol Rep,2019,21(8):67. doi:10.1007/s11912 - 019 - 0820 - 4.

[3] Feng W,Ding Y,Zong W,et al. Non-coding RNAs in regulating gastric cancer metastasis[J]. Clin Chim Acta,2019,496:125 - 133. doi:10.1016/j.cca.2019.07.003.

[4] Li PF,Chen SC,Xia T,et al. Non-coding RNAs and gastric cancer[J]. World J Gastroenterol,2014,20(18):5411 - 5419. doi:10.3748/wjg.v20.i18.5411.

[5] Xia J,Guo X,Yan J,et al. The role of miR-148a in gastric cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2014,140(9):1451 - 1456. doi:10.7150/jca.14616.

[6] 毛玉娣. 微小 RNA 与胃癌关系的研究进展[J]. 中国药理学通报,2016,32(6):756 - 760. doi:10.3969/j.issn.1001 - 1978.2016.06.004.

[7] Liu D, Hu X, Zhou H, et al. Identification of aberrantly expressed miRNAs in gastric cancer[J]. Gastroenterol Res Pract, 2014, 2014: 473817. doi:10.1155/2014/473817.

[8] 杨之洵. 中国胃癌发病趋势及预测[J]. 中国肿瘤,2019,28(5):321 - 326. doi:10.11735/j.issn.1004 - 0242.2019.05.A001.

[9] Song Z, Wu Y, Yang J, et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2017, 39(7): 1010428317714626. doi:10.1177/1010428317714626.

[10] 邹文斌. 中国胃癌发病率及死亡率研究进展[J]. 中国实用内科杂志,2014,34(4):408 - 415.

[11] 王文尖,罗 琼,覃世运,等. 三种 microRNA 在胃癌患者中的表达及临床意义[J]. 中国免疫学杂志,2019,35(11):1363 - 1367. doi:10.3969/j.issn.1000 - 484X.2019.11.016.

[12] Gupta G, Chellappan DK, de Jesus Andreoli Pinto T, et al. Tumor suppressor role of miR-503[J]. Panminerva Med,2018,60(1):17 - 24. doi:10.23736/S0031 - 0808.17.03386 - 9.

[13] Kojima M, Sudo H, Kawauchi J, et al. MicroRNA markers for the diagnosis of pancreatic and biliary-tract cancers[J]. PLoS One,2015, 10(2):e0118220. doi:10.1371/journal.pone.0118220.

[14] Qin C, Huang RY, Wang ZX. Potential role of miR-100 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy[J]. Tumour Biol, 2015, 36(3): 1403 - 1409. doi:10.1007/s13277 - 015 - 3267 - 8.

[15] 龚 攀,常 城,顾 园,等. miR-6751-3p 在胃癌细胞增殖和迁移中的作用机制研究[J]. 国际外科学杂志,2021,48(8):514 - 519. doi:10.3760/cma.j.issn115396 - 20210221 - 00056.

[16] Li J, Xu X, Liu C, et al. MiR-490-5p restrains progression of gastric cancer through DTL repression[J]. Gastroenterol Res Pract, 2021, 2021:2894117. doi:10.1155/2021/2894117.

[17] Gao P, Wang H, Yu J, et al. MiR-3607-3p suppresses non-small cell lung cancer (NSCLC) by targeting TGFBR1 and CCNE2[J]. PLoS Genet, 2018, 14(12): e1007790. doi: 10.1371/journal.pgen.1007790.

[18] Dou W, Yang M, Su Y, et al. Dysregulation of miR-3607 predicts prognosi s of hepatocellular carcinoma and regulates tumor cell proliferation, migration and invasion[J]. Apoptosis, 2020, 15(1):54. doi:10.1186/s13000 - 020 - 00973 - 5.

[19] Lei L,Zhao X,Liu S,et al. MicroRNA-3607 inhibits the tumorigenesis of colorectal cancer by targeting DDI2 and regulating the DNA damage repair pathway[J]. Apoptosis, 2019, 24(7 - 8):662 - 672. doi:10.1007/s10495 - 019 - 01549 - 5.

(编辑:杨 颖)