doi:10.11659/jjssx.10E021105

·基础研究·

下调 miR-221 诱导胃癌细胞凋亡的机制及其化疗敏感性研究

杨向超,田由京,陈 禺,李 合 (海南医学院第一附属医院普通外科,海南 海口 570102)

[摘 要] **目的** 探究下调 miR-221 诱导人胃癌细胞凋亡的机制,及其对胃癌细胞化疗敏感性的影响。**方法** 实时荧光定量 PCR 检测正常胃黏膜上皮细胞 NGEC 与4 种胃癌细胞系(SGC-7901、BGC-823、MGC803、MKN-28)中 miR-221 表达水平;将 SGC-7901 细胞随机分为 5 组:空白对照组(常规培养)、Anti-miR-NC 组(转染 inhibitor control)、Anti-miR-221 组(转染 miR-221 inhibitor)、Anti-miR-221 + siRNA-NC 组(转染 miR-221 inhibitor 后再转染 siRNA 阴性对照)、Anti-miR-221 + siRNA-Parkin 组(转染 miR-221 inhibitor 后再转染 siRNA-Parkin),Lipofectamine 2000 脂质体介导法转染 SGC-7901 细胞。MTT 法检测细胞活性;JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位;Western blot 检测自噬相关蛋白的表达水平;Hoechst 33342 染色和 Annexin Ⅴ-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡情况。使用不同浓度奥沙利铂(2.5、5、10、20、40、80 μg/mL)处理各组 SGC-7901 细胞 48 h,MTT 法检测细胞增殖抑制率,计算 IC50。**结果** 4 种胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、MGC803、MKN-28 的 miR-221 相对表达水平较正常胃黏膜上皮细胞 NGEC 升高($P<0.05$)。与空白对照组比较,Anti-miR-221 组 SGC-7901 细胞在转染 24、48、72 h 时活性下降,细胞线粒体膜电位下降,Pink1、Parkin 蛋白表达水平升高,P62 蛋白表达水平下降,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值上调,细胞核浓缩并有碎裂的蓝色凋亡体,细胞凋亡率升高,经过奥沙利铂处理后细胞增殖抑制率升高,IC50 下降,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。与 Anti-miR-221 组比较,Anti-miR-221 + siRNA-Parkin 组 SGC-7901细胞在转染 48 h和 72 h 时活性升高,细胞线粒体膜电位升高,Pink1、Parkin 蛋白表达水平下降,P62 蛋白表达水平升高,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值下调,细胞核浓缩明显减少,细胞凋亡率降低,经过奥沙利铂处理后细胞增殖抑制率下降,IC50 升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 下调 miR-221 表达可通过调节 Parkin 介导的线粒体自噬途径诱导胃癌细胞发生凋亡,增加胃癌细胞对奥沙利铂的化疗敏感性。

[关键词] 胃癌;miR-221;线粒体途径;化疗敏感性

[中图分类号] R735.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-10-21

Mechanism of down-regulation of miR-221-induced apoptosis of gastric cancer cells and its chemotherapy sensitivity

YANG Xiang-chao, TIAN You-jing, CHEN Yu, LI He (Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou Hainan 570102, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of down-regulation of miR-221 inducing apoptosis of human gastric cancer cells and its effect on chemotherapy sensitivity of gastric cancer cells. **Methods** Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression levels of miR-221 in normal gastric mucosal epithelial cells NGEC and 4 types of gastric cancer cell lines (SGC-7901, BGC-823, MGC803, MKN-28). The SGC-7901 cells were randomly divided into 5 groups: the blank control group (routine culture), the Anti-miR-NC group (transfected with inhibitor control), the Anti-miR-221 group (transfected with miR-221 inhibitor), the Anti-miR-221 + siRNA-NC group (transfected with miR-221 inhibitor and then transfected with siRNA negative control), the Anti-miR-221 + siRNA-Parkin group (transfected with miR-221 inhibitor and then transfected with siRNA-Parkin), and the SGC-7901 cells were transfected by Lipofectamine 2000 liposome-mediated method. MTT method was used to detect cell viability; JC-1 fluorescent probe was used to detect mitochondrial membrane potential; Western blot was used to detect the expression level of autophagy-related proteins; Hoechst 33342 staining and Annexin Ⅴ-FITC/PI double staining method were used to detect cell apoptosis. The SGC-7901 cells in each group were treated with different concentrations of oxaliplatin (2.5, 5, 10, 20, 40, 80 μg/mL) for 48 hours, MTT method was used to detect the cell proliferation inhibition rate, and the IC50 was calculated. **Results** The relative expression levels of miR-221 in the 4 types of gastric cancer cell lines SGC-7901, BGC-823, MGC803 and MKN-28 were higher than those of normal gastric mucosal epithelial cells NGEC ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the cell viability of SGC-7901 cells in the Anti-miR-221 group 24, 48 and 72 hours after transfection was decreased; the mitochondrial membrane potential of the cells was decreased, the expression levels of Pink1 and Parkin proteins were increased, the expression level of P62

[基金项目] 海南省医药卫生科研项目(2001320672A2002)

[通信作者] 李 合,E-mail:46208372@qq.com

protein was decreased, the ratio of LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ was up-regulated, and the cell nuclei were concentrated with fragmented blue apoptotic bodies, the cell apoptosis rate was increased, the cell proliferation inhibition rate after oxaliplatin treatment was increased, and the IC50 was decreased, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the Anti-miR-221 group, the cell viability of SGC-7901 cells in the anti-miR-221 + siRNA-Parkin group 48 and 72 hours after transfection was increased, the mitochondrial membrane potential of the cells was increased, the expression levels of Pink1 and Parkin proteins were decreased, the expression level of P62 protein was increased, the ratio of LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ was down-regulated, the cell nuclei concentration was significantly reduced, the cell apoptosis rate was decreased, the cell proliferation inhibition rate after oxaliplatin treatment was decreased, and the IC50 was increased, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Down-regulation of miR-221 expression can induce apoptosis of gastric cancer cells by regulating Parkin-mediated mitochondrial autophagy pathway, and increase the chemotherapy sensitivity of gastric cancer cells to oxaliplatin.

Keywords: gastric cancer; miR-221; mitochondrial pathway; chemotherapy sensitivity

胃癌属于消化道肿瘤,在全球范围内具有较高的发病率和病死率[1]。手术切除是早期胃癌最有效的治疗方法,然而,由于缺乏精确的早期诊断标准,大部分患者诊断时已处于癌症晚期[2-3]。在晚期胃癌的治疗过程中,化疗药物耐药性的产生导致患者预后差,病死率高[4]。越来越多的研究表明,参与介导肿瘤细胞耐药性发生的机制复杂,因此,探究早期诊断的特异性生物标志物以及克服肿瘤细胞耐药性仍是胃癌研究中的两大重点内容。

MicroRNA(miRNA)是具有约 22 个核苷酸的内源性单链 RNA 分子,是高度保守的非编码 RNA,能够与目标信使 RNA(mRNA)的 3'-UTR 结合,从而抑制其表达和翻译。miRNA 现已用于癌症或其他疾病的诊断研究中。miR-221 已被证明与多种类型肿瘤相关,如 Aslam 等[5]研究表明,miR-221 是结直肠癌的新型生物标志物;Shah 等[6]指出 miR-221 和 miR-222 参与了侵袭性细胞基底样乳腺癌的上皮—间充质转化;Zhang 等[7]研究发现高水平的 miR-221 和 miR-222 可使神经胶质瘤细胞浸润增加和预后不良。由此可见,miR-221 可能在肿瘤的发生发展中发挥一定的促癌作用。此外,有研究指出,miR-221 能够影响胃癌耐药细胞增殖和化疗敏感性[8]。但关于靶向下调 miR-221 介导胃癌细胞凋亡及其影响胃癌细胞化疗敏感性的具体机制尚未明确。鉴于此,本研究通过检测 4 种胃癌细胞系(SGC-7901、BGC-823、MGC803、MKN-28)中 miR-221 表达水平,并使用 siRNA 技术下调 miR-221,观察其对肿瘤细胞凋亡及化疗敏感性的影响,并初步探究其作用机制,以期为肿瘤的靶向治疗及克服肿瘤细胞耐药的研究提供新方案。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

将正常胃黏膜上皮细胞 NGEC 与 4 种胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、MGC803、MKN-28[中国科学院典型培养物保藏委员会(上海)细胞库]加入 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青—链霉素),置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,在生长对数期用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

奥沙利铂购自齐鲁制药有限公司,逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 GeneCopoeia 公司,TRIzol 试剂盒和 Lipofectamine 2000 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,JC-1 荧光探针试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司,MTT 试剂、Hoechst 33342 染色试剂盒及 Annexin Ⅴ-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自上海哈灵生物有限公司,BCA 蛋白定量试剂盒和 PVDF 膜购自上海碧云天生物研究所,兔抗人 Pink1、Parkin、LC3-Ⅱ、LC3-Ⅰ及 P62 单克隆抗体购自英国 Abcam公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 和鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,其他试剂均为国产分析纯。miR-221 inhibitor、inhibitor control、siRNA-Parkin 及 siRNA-NC 序列均由上海吉玛制药技术有限公司设计合成。

1.2 实时荧光定量 PCR 检测 miR-221 表达水平

采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,Nanodrop 检测仪测定提取的总 RNA 纯度和浓度。采用逆转录试剂盒合成反转录序列,以实时荧光定量 PCR 试剂盒测定 miR-221 表达水平,以 U6 作为内参基因,扩增程序设置为:95 ℃ 10 min,1 个循环;95 ℃ 20 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 10 s,共 40 个循环。引物序列:miR-221 上游引物,5'-TCGTGGGAGCTACATTGTCTGC-3',下游引物,5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';U6 上游引物,5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游引物,5'-AACGCTTCAGAATTTGCGT-3'。扩增结束后,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-221 相对表达水平。

1.3 细胞转染

取对数生长期的 SGC-7901 细胞以 1×10^5 个/孔

的密度接种于12孔板中,置于37 ℃、5% CO_2恒温培养箱中培养,融合度达到80%时,进行转染实验。将细胞随机分为5组:空白对照组、Anti-miR-NC组、Anti-miR-221组、Anti-miR-221 + siRNA-NC组、Anti-miR-221 + siRNA-Parkin组。空白对照组进行常规培养,利用Lipofectamine 2000脂质体介导法将inhibitor control及miR-221 inhibitor分别转染至Anti-miR-NC组和Anti-miR-221组细胞中,置于培养箱内转染6 h,更换新鲜培养基,继续培养48 h后,通过实时荧光定量PCR检测转染效果;Anti-miR-221 + siRNA-NC组和Anti-miR-221 + siRNA-Parkin组在转染miR-221 inhibitor后分别转染siRNA阴性对照及siRNA-Parkin至细胞,继续培养48 h后,收集细胞,进行后续实验。

1.4 MTT法检测转染后细胞活性

将各组SGC-7901细胞以2×10^4个/孔的密度接种至96孔板,置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,分别在0、12、24、48、72 h时每孔加入20 μL MTT(5 mg/mL),继续孵育4 h,弃去培养液,每孔加入150 μL的DMSO,置于摇床振荡至蓝紫色结晶甲瓒完全溶解,通过酶标仪在490 nm处检测各孔细胞的吸光度值(A值)。

1.5 JC-1荧光探针检测线粒体膜电位

将各组SGC-7901细胞以1×10^4个/孔的密度接种至12孔板中培养过夜,加入JC-1荧光探针工作液(1 μg/mL),置于37 ℃、5% CO_2培养箱中避光孵育30 min,PBS洗涤细胞,以1 000 r/min离心5 min,弃上清液,加入PBS重悬细胞,倒置荧光显微镜下观察各组细胞荧光表达情况。

1.6 Western blot检测自噬相关蛋白表达水平

利用RIPA裂解液提取各组SGC-7901细胞总蛋白,BCA法检测提取的蛋白浓度。取各组蛋白样品50 μg上样通过10% SDS-PAGE电泳(电压90 V,时间20 min,后上调电压至120 V,时间60 min)进行分离,电转移(电压25 V,时间25 min)至PVDF膜,在5%脱脂奶粉中室温封闭1 h,加入一抗,4 ℃孵育过夜;次日弃一抗液,TBST洗膜,并加入对应二抗,室温孵育2 h,TBST洗膜,ECL显色,凝胶成像系统中曝光,Image J软件分析各条带灰度值,以GAPDH作为内参蛋白。

1.7 Hoechst 33342染色和Annexin Ⅴ-FITC/PI双染法检测细胞凋亡水平

收集各组SGC-7901细胞,用4%多聚甲醛进行固定,滴加0.5% Triton X-100透化15 min,PBS洗涤细胞,滴加终浓度5 mg/L的Hoechst 33342染色,室温避光孵育30 min,PBS再次洗涤细胞,脱水后封片干燥,荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

用PBS洗涤各组SGC-7901细胞,以1 000 r/min离心3 min,弃上清液,加入适量1 × binding buffer重悬,调节浓度为1×10^6/mL,取100 μL细胞悬液并加入5 μL Annexin V-FITC,混匀,室温避光孵育5 min,再加10 μL PI,混匀,继续孵育10 min后,采用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

1.8 MTT法检测各组细胞对奥沙利铂的敏感性

SGC-7901细胞转染48 h后,使用不同浓度奥沙利铂(2.5、5、10、20、40、80 μg/mL)分别处理空白对照组、Anti-miR-NC组、Anti-miR-221组、Anti-miR-221 + siRNA-NC组、Anti-miR-221 + siRNA-Parkin组的SGC-7901细胞48 h,MTT法检测各组SGC-7901细胞的半数抑制浓度(IC50),使用SPSS 23.0软件分析各组SGC-7901细胞IC50。药物处理结束后,每孔加入20 μL MTT(5 mg/mL)孵育4 h,加入150 μL DMSO摇床振荡至蓝紫色结晶甲瓒完全溶解后,使用酶标仪在490 nm处检测各孔细胞的A值,计算细胞增殖抑制率,增殖抑制率(%) = (1 − 实验组A值/对照组A值) × 100%。

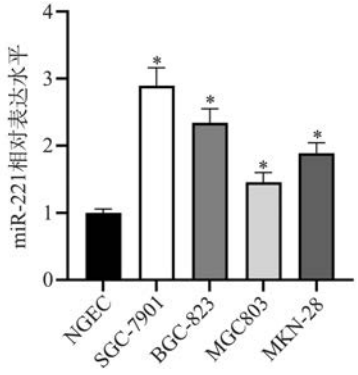
1.9 统计学分析

采用SPSS 23.0统计学软件进行数据分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用*LSD-t*检验,$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常胃黏膜上皮细胞与胃癌细胞miR-221表达

实时荧光定量PCR检测结果显示,与正常胃黏膜上皮细胞NGEC比较,4种胃癌细胞系SGC-7901、BGC-823、MGC803、MKN-28的miR-221相对表达水平明显升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见图1。4种胃癌细胞系中SGC-7901的miR-221表达水平最高,因此选择该细胞系进行后续实验。



*:与NGEC比较,$P < 0.05$

图1 各细胞中miR-221表达水平比较

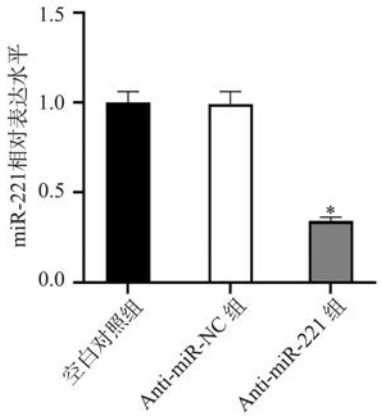
2.2 转染后胃癌细胞 miR-221 表达及活性变化

实时荧光定量 PCR 检测转染后 SGC-7901 细胞中 miR-221 表达,结果显示,Anti-miR-221 组 SGC-7901 细胞中 miR-221 表达水平较空白对照组下降,差异具有统计学意义($P<0.05$);而 Anti-miR-NC 组与空白对照组 miR-221 表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2。

MTT 法结果显示,在转染 24、48、72 h 时,Anti-miR-221组 SGC-7901 细胞活性较空白对照组下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),Anti-miR-NC 组与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);与 Anti-miR-221 组比较,在转染 48 h 和 72 h 时 Anti-miR-221 + siRNA-Parkin 组细胞活性升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),而 Anti-miR-221 组与 Anti-miR-221 + siRNA-NC 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3。

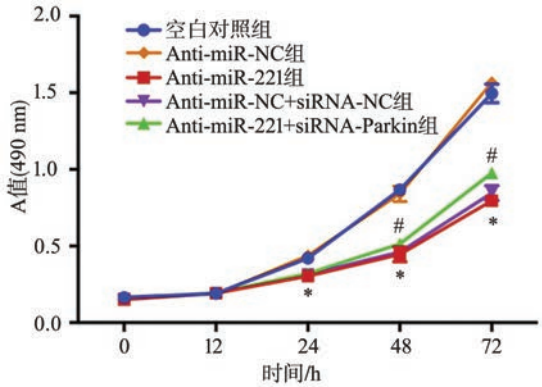
2.3 下调 miR-221 表达对 Parkin 介导胃癌细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 荧光探针检测发现,与空白对照组比较,Anti-miR-221 组 SGC-7901 细胞红色荧光减弱而绿色荧光增加($P<0.05$),线粒体膜电位下降($P<0.05$);Anti-miR-NC 组细胞红色荧光和绿色荧光与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);与 Anti-miR-221 组比较,Anti-miR-221 + siRNA-Parkin 组红色荧光增加($P<0.05$),绿色荧光有所减弱($P<0.05$),线粒体膜电位升高($P<0.05$),Anti-miR-221 + siRNA-NC 组细胞荧光强度未发生明显变化,见图 4。



*:与空白对照组比较,$P<0.05$

图 2 转染后细胞中 miR-221 表达水平比较



*:与空白对照组比较,$P<0.05$;#:与 Anti-miR-221 组比较,$P<0.05$

图 3 MTT 法检测各组 SGC-7901 细胞活性

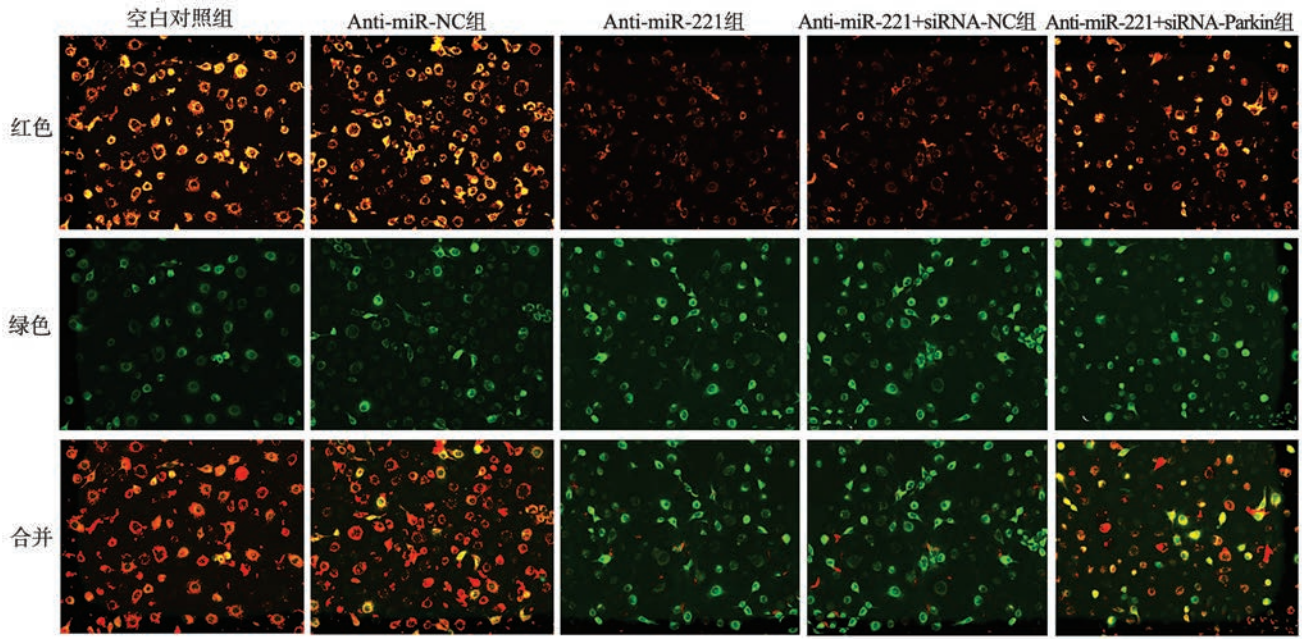


图 4 各组 SGC-7901 细胞线粒体膜电位(JC-1 荧光探针,×100)

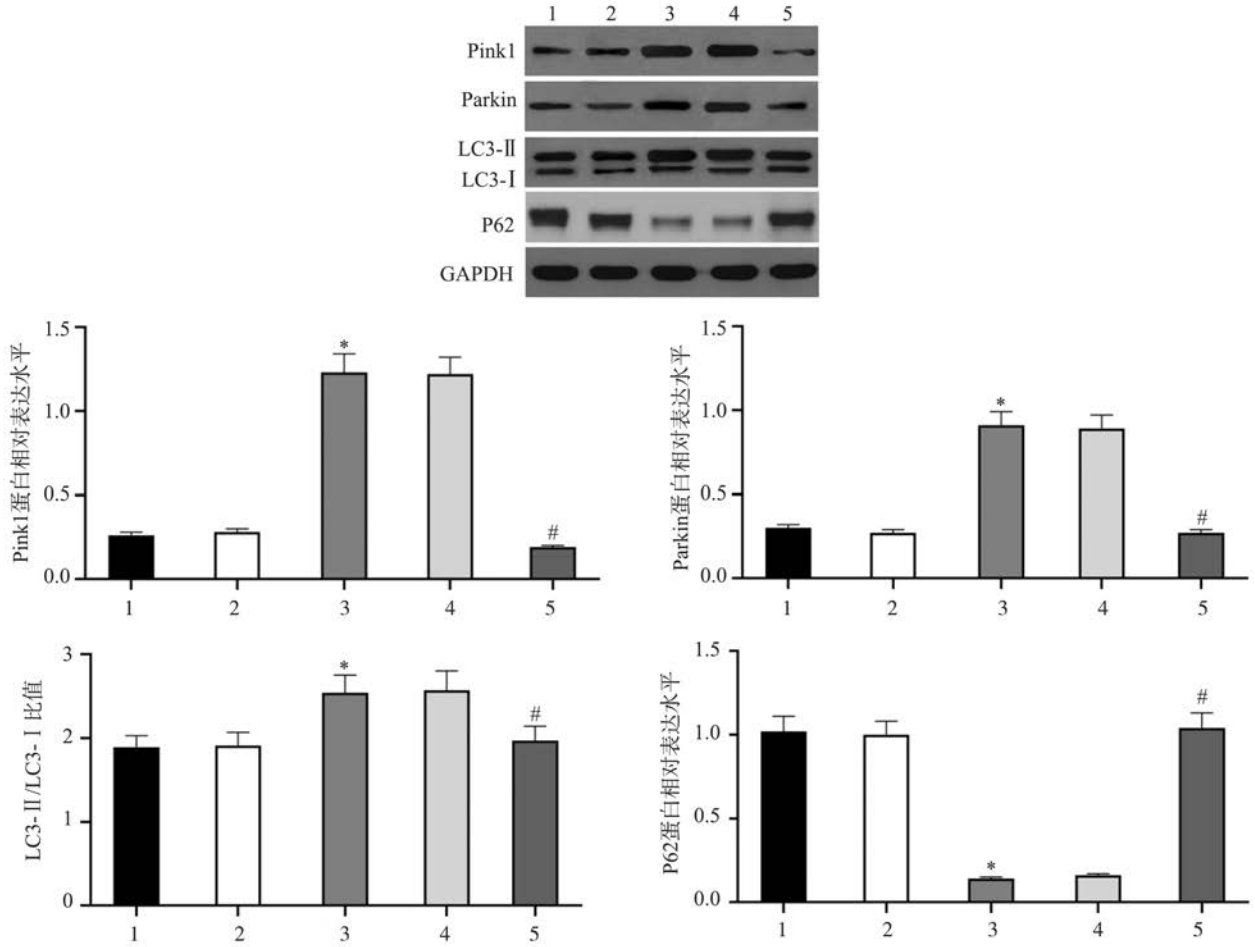
2.4 下调 miR-221 表达对 Parkin 介导胃癌细胞自噬相关蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,与空白对照组比较,Anti-miR-221 组 SGC-7901 细胞 Pink1、Parkin 蛋白表达水平升高,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值上调,P62 蛋白表达水平下降,差异均具有统计学意义($P<0.05$),Anti-miR-NC 组各蛋白表达水平与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);与 Anti-miR-221 组比较,Anti-miR-221 + siRNA-Parkin 组细胞 Pink1、Parkin 蛋白表达水平下降,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值下调,P62 蛋白表达水平升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$),而 Anti-miR-221 + siRNA-NC 组各蛋白表达水平与 Anti-miR-221 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 5。

2.5 下调 miR-221 表达对 Parkin 介导胃癌细胞凋亡的影响

Hoechst 33342 染色结果显示,空白对照组和 Anti-miR-NC 组 SGC-7901 细胞胞核外围轮廓较为清晰,大小一致,无明显核浓缩现象;Anti-miR-221 组和 Anti-miR-221 + siRNA-NC 组细胞出现较多核浓缩、碎裂的蓝色凋亡体,说明凋亡细胞数目较多;而 Anti-miR-221 + siRNA-Parkin 组细胞中核浓缩现象较 Anti-miR-221 组减少,说明凋亡细胞数目减少,见图 6。

Annexin Ⅴ-FITC/PI 双染法检测结果显示,Anti-miR-221 组 SGC-7901 细胞凋亡率较空白对照组明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),而 Anti-miR-NC 组细胞凋亡率与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);Anti-miR-221 + siRNA-Parkin 组细胞凋亡率较 Anti-miR-221 组降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),Anti-miR-221 + siRNA-NC 组与 Anti-miR-221 组细胞凋亡率比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 7。



1:空白对照组;2:Anti-miR-NC 组;3:Anti-miR-221 组;4:Anti-miR-221 + siRNA-NC 组;5:Anti-miR-221 + siRNA-Parkin 组 *:与空白对照组比较,$P<0.05$;#:与 Anti-miR-221 组比较,$P<0.05$

图 5 各组 SGC-7901 细胞自噬相关蛋白表达水平

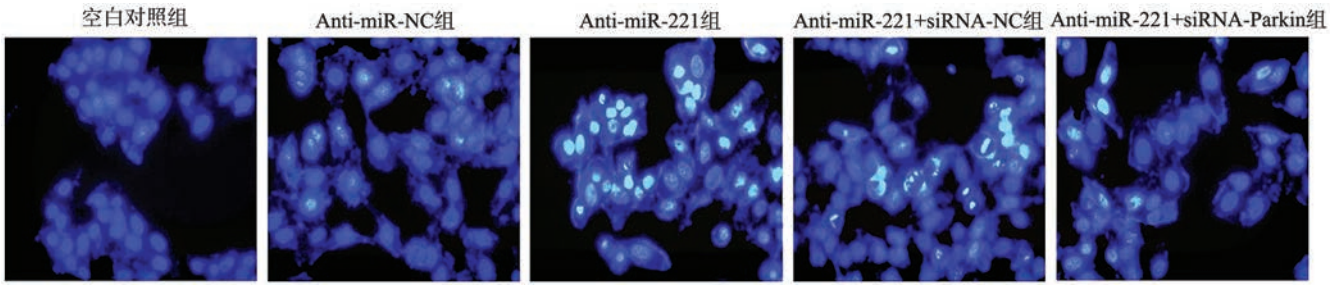
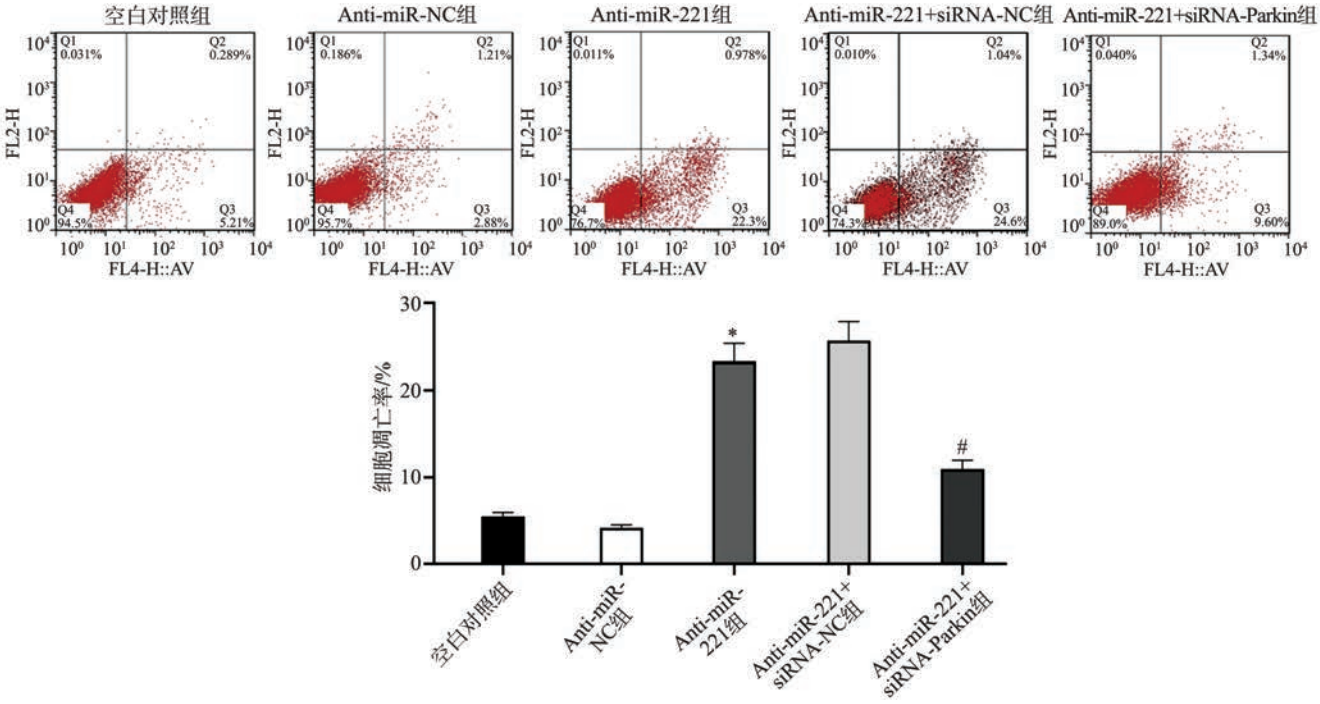


图 6 各组 SGC-7901 细胞凋亡情况(Hoechst 33342 染色,×200)



*:与空白对照组比较,$P<0.05$;#:与 Anti-miR-221 组比较,$P<0.05$

图 7 各组 SGC-7901 细胞凋亡情况(Annexin V-FITC/PI 双染法)

2.6 下调 miR-221 表达对胃癌细胞化疗敏感性的影响

不同浓度奥沙利铂(2.5、5、10、20、40、80 μg/mL)处理各组 SGC-7901 细胞后,经 MTT 法检测发现,各组细胞存活率均呈下降趋势,IC50 分别为 8.14、8.07、4.79、4.74、7.23 μg/mL,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与空白对照组比较,Anti-miR-221 组细胞增殖抑制率升高,IC50 下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),Anti-miR-NC 组与空白对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);Anti-miR-221 + siRNA-Parkin组的 SGC-7901 细胞增殖抑制率较 Anti-miR-221 组有所下降,IC50 较 Anti-miR-221 组升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$),Anti-miR-221 + siRNA-NC 组与 Anti-miR-221 组细胞增殖抑制率、IC50 比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 不同浓度奥沙利铂对各组 SGC-7901 细胞的增殖抑制率(%)

奥沙利铂	空白对照组	Anti-miR-NC 组	Anti-miR-221 组	Anti-miR-221 + siRNA-NC 组	Anti-miR-221 + siRNA-Parkin 组
2.5 μg·mL^{-1}	32.34±2.78	33.02±2.89	40.58±3.67*	41.76±3.85	36.76±3.03#
5 μg·mL^{-1}	43.80±3.94	43.69±3.76	51.70±4.98*	52.43±5.07	45.56±4.14#
10 μg·mL^{-1}	57.44±5.45	58.52±5.67	64.89±6.09*	65.02±6.21	60.52±5.74#
20 μg·mL^{-1}	64.34±6.12	63.05±6.08	72.03±7.17*	73.12±7.05	65.69±6.83#
40 μg·mL^{-1}	75.34±7.15	76.51±7.20	83.34±7.65*	84.09±7.82	79.47±7.35#
80 μg·mL^{-1}	87.76±8.08	87.83±8.37	94.76±8.08*	95.09±9.11	89.03±8.69#

*:与空白对照组比较,$P<0.05$;#:与 Anti-miR-221 组比较,$P<0.05$

3 讨论

胃癌的发生过程十分复杂,涉及肿瘤相关基因的结构变异和表达变化。miRNA 在肿瘤的发生发展中起着重要作用,对于不同类型的癌症来说其可能是非侵入性诊断和预后的生物标志物。以往研究表明,miRNA 诱导的基因沉默与癌变之间的相互作用是胃癌研究中的热点之一,胃癌中异常表达的 miRNA 在癌症诊治中具有重要价值[9]。目前已发现多种 miRNA 在胃癌患者组织或血液中存在异常表达,如胃癌患者血清中 miR-21、miR-146a 和 miR-148a 的水平与胃癌 pN 分期密切相关,这些 miRNA 水平可能是预测淋巴结转移的生物标志物[10];miR-6778-5p 通过靶向 YWHAE 来反馈调节宿主基因 SHMT1 的表达水平,从而增强胃癌干细胞的干性,使肿瘤细胞维持恶性生物学特性[11];miR-374-5p 通过靶向 SRCIN1 和 RECK 基因来促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭[12-13]。

本研究通过检测正常胃黏膜上皮细胞 NGEC 和 4 种胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823、MGC803、MKN-28中 miR-221 表达水平发现,miR-221 在 4 种胃癌细胞系中均呈现异常高表达,因此推测 miR-221 可能参与胃癌的发生发展。目前,关于 miR-221 在其他肿瘤中的作用研究逐渐增加,如 Gramantieri 等[14]研究发现在肝细胞癌及复发的肝细胞癌患者中 miRNA-221 表达升高,揭示 miRNA-221 通过靶向 Bmf 参与肝细胞癌的发生,并与肿瘤大小、组织病理学分级、肿瘤多灶性等相关;Lu 等[15]指出 miR-221 通过抑制肿瘤抑制因子 TIMP2 从而在肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭中充当致癌基因;Teixeira 等[16]研究表明血浆样本中 miR-221 的过表达与肾细胞癌患者的总生存期缩短有关。由此可见,miR-221 高表达可能促进一些肿瘤的恶性进展。胃癌作为恶性程度较高的肿瘤,一方面,由于缺乏典型的早期症状,大多数胃癌患者被诊断时已为晚期;另一方面,在治疗过程中耐药性的产生使得患者的治疗效果降低,预后较差[2]。尽管目前已有大量研究分析了胃癌发生和发展的分子机制,但要确定用于胃癌检测治疗的特异性新靶标并克服肿瘤细胞的耐药性仍然是一项巨大挑战。

大量研究表明,miRNA 参与调控癌症化疗过程,这为克服胃癌细胞耐药性提供了潜在的靶点。如 miR-197 和 miR-130b 分别通过靶向信号转导和转录激活因子 3 与 Wnt/β-catenin 途径导致非小细胞肺癌细胞产生顺铂耐药性[17-18],相反,miR-125a-5p 能够通过靶向信号转导和转录激活因子 3 减少其水平来逆转食管鳞状细胞癌的顺铂耐药性[19];与邻近正常组织相比,胰腺癌组织及胰腺癌顺铂耐药细胞中的 miR-374b-5p 表达水平均降低,而 miR-374b-5p 通过直接靶向抗凋亡蛋白 Bcl-2、BIRC3 和 XIAP 增强肿瘤细胞的化学敏感性[20]。此外,已有研究表明 miRNA-221 参与调控胃癌细胞的放射抗性[21]。奥沙利铂是胃癌的一线化疗药物,与 5-氟尿嘧啶联合使用具有协同作用。本研究通过转染 miRNA-221 inhibitor 抑制胃癌细胞中 miRNA-221 表达后发现胃癌细胞对奥沙利铂的化疗敏感性增加,提示 miRNA-221 可能参与调节胃癌细胞的化疗敏感性。

凋亡是受基因控制的自主而有序的细胞死亡过程,在生物体进化、内环境稳定性以及多种系统的发展中均起着重要作用。凋亡途径主要分为两种,一种是细胞死亡受体介导的外源信号传导途径,细胞死亡受体可以诱导 Caspase-8 和 Caspase-10 激活,鉴于一些 Bcl-2 家族成员蛋白触发了与线粒体相关的内在凋亡途径,且随后激活了 Caspase-9 和 Caspase-3,从而导致细胞死亡;另一种是线粒体内质网相关的内源信号传导途径,随着过度的内质网应激、超载的自由基和 Ca^{2+} 在雌激素受体管腔中产生并转化为细胞质和线粒体,使得线粒体受到这些超负荷压力的干扰,触发下游一系列反应而诱导细胞凋亡[22-23]。内源性途径可以由线粒体膜电位的丧失触发,线粒体膜电位下降是细胞死亡的早期事件。当线粒体受损时,蛋白激酶 Pink1 聚集于线粒体外膜同时激活 Parkin,并将 Parkin 招募到受损线粒体上,通过一系列作用启动线粒体自噬途径[24]。本研究结果显示,在下调 miRNA-221 表达的胃癌细胞中检测到线粒体膜电位下降,促进了细胞凋亡的发生。为了进一步探讨该作用的可能机制,本研究通过在下调 miRNA-221 的胃癌细胞中转染 siRNA-Parkin 抑制细胞线粒体自噬途径后发现,Pink1、Parkin 蛋白表达水平下降,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值下调,P62 蛋白表达水平升高,同时,线粒体膜电位升高,抑制了细胞的凋亡,并且降低了胃癌细胞的化疗敏感性。

综上所述,miRNA-221 参与调控 Parkin 介导的线粒体自噬途径,从而影响胃癌细胞的凋亡与化疗敏感性,下调 miRNA-221 表达可激活 Parkin 介导的胃癌细胞线粒体自噬途径进而诱导细胞凋亡,增加胃癌细胞对奥沙利铂的化疗敏感性。这一结果提示,miRNA-221 可能是胃癌治疗的一个潜在靶点,线粒体途径可能是 miRNA-221 调控胃癌细胞凋亡与化疗敏感性的途径之一,这将有助于阐明胃癌的发病机制,并为克服胃癌化疗耐药性的研究提供参考。

[参考文献]

[1] Waldum H,Fossmark R. Gastritis,gastric polyps and gastric cancer[J]. Int J Mol Sci,2021,22(12):6548. doi:10.3390/ijms22126548.

[2] Assumpcao P,Araujo T,Khayat A,et al. Hereditary gastric cancer:three rules to reduce missed diagnoses[J]. World J Gastroenterol,2020,26(13):1382-1393. doi:10.3748/wjg.v26.i13.1382.

[3] Yao K,Uedo N,Kamada T,et al. Guidelines for endoscopic diagnosis of early gastric cancer[J]. Dig Endosc,2020,32(5):663-698. doi:10.1111/den.13684.

[4] 刘宇佳,胡晓平,钟里科,等. 胃癌新辅助化疗耐药机制及治疗策略研究[J]. 中国现代应用药学,2019,36(15):1914-1918. doi:10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.15.012.

[5] Aslam MI,Taylor K,Pringle JH,et al. MicroRNAs are novel biomarkers of colorectal cancer[J]. Br J Surg,2009,96(7):702-710. doi:10.1002/bjs.6628.

[6] Shah MY,Calin GA. MicroRNAs miR-221 and miR-222:a new level of regulation in aggressive breast cancer[J]. Genome Med,2011,3(8):56. doi:10.1186/gm272.

[7] Zhang C,Zhang J,Hao J,et al. High level of miR-221/222 confers increased cell invasion and poor prognosis in glioma[J]. J Transl Med,2012,10:119. doi:10.1186/1479-5876-10-119.

[8] 徐丽娜,金莉娜. 下调 MiR-221 对胃癌顺铂耐药细胞增殖及顺铂敏感性的影响及其相关机制[J]. 世界华人消化杂志,2019,27(14):857-863.

[9] Alessandrini L,Manchi M,De Re V,et al. Proposed molecular and miRNA classification of gastric cancer[J]. Int J Mol Sci,2018,19(6):1683. doi:10.3390/ijms19061683.

[10] Kim SY,Jeon TY,Choi CI,et al. Validation of circulating miRNA biomarkers for predicting lymph node metastasis in gastric cancer[J]. J Mol Diagn,2013,15(5):661-669. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.04.004.

[11] Zhao M,Hou Y,Du YE,et al. Drosha-independent miR-6778-5p strengthens gastric cancer stem cell stemness via regulation of cytosolic one-carbon folate metabolism[J]. Cancer Lett,2020,478:8-21. doi:10.1016/j.canlet.2020.02.040.

[12] Xie J,Tan ZH,Tang X,et al. MiR-374b-5p suppresses RECK expression and promotes gastric cancer cell invasion and metastasis[J]. World J Gastroenterol,2014,20(46):17439-17447. doi:10.3748/wjg.v20.i46.17439.

[13] Xu X,Wang W,Su N,et al. miR374a promotes cell proliferation,migration and invasion by targeting SRCIN1 in gastric cancer[J]. FEBS Lett,2015,589(3):407-413. doi:10.1016/j.febslet.2014.12.027.

[14] Gramantieri L,Fornari F,Ferracin M,et al. MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality[J]. Clin Cancer Res,2009,15(16):5073-5081. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0092.

[15] Lu GJ,Dong YQ,Zhang QM,et al. miRNA-221 promotes proliferation,migration and invasion by targeting TIMP2 in renal cell carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol,2015,8(5):5224-5229.

[16] Teixeira AL,Ferreira M,Silva J,et al. Higher circulating expression levels of miR-221 associated with poor overall survival in renal cell carcinoma patients[J]. Tumour Biol,2014,35(5):4057-4066. doi:10.1007/s13277-013-1531-3.

[17] Fujita Y,Yagishita S,Hagiwara K,et al. The clinical relevance of the miR-197/CKS1B/STAT3-mediated PD-L1 network in chemoresistant non-small-cell lung cancer[J]. Mol Ther,2015,23(4):717-727. doi:10.1038/mt.2015.10.

[18] Zhang Q,Zhang B,Sun L,et al. MicroRNA-130b targets PTEN to induce resistance to cisplatin in lung cancer cells by activating Wnt/β-catenin pathway[J]. Cell Biochem Funct,2018,36(4):194-202. doi:10.1002/cbf.3331.

[19] Zhao Y,Ma K,Yang S,et al. MicroRNA-125a-5p enhances the sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells to cisplatin by suppressing the activation of the STAT3 signaling pathway[J]. Int J Oncol,2018,53(2):644-658. doi:10.3892/ijo.2018.4409.

[20] Sun D,Wang X,Sui G,et al. Downregulation of miR-374b-5p promotes chemotherapeutic resistance in pancreatic cancer by upregulating multiple anti-apoptotic proteins[J]. Int J Oncol,2018,52(5):1491-1503. doi:10.3892/ijo.2018.4315.

[21] Chun-Zhi Z,Lei H,An-Ling Z,et al. MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN[J]. BMC Cancer,2010,10:367. doi:10.1186/1471-2407-10-367.

[22] Jia LT,Chen SY,Yang AG. Cancer gene therapy targeting cellular apoptosis machinery[J]. Cancer Treat Rev,2012,38(7):868-876. doi:10.1016/j.ctrv.2012.06.008.

[23] Wang L,Qi H,Tang Y,et al. Post-translational modifications of key machinery in the control of mitophagy[J]. Trends Biochem Sci,2020,45(1):58-75. doi:10.1016/j.tibs.2019.08.002.

[24] 张晓放,李思琦,张 强,等. Parkin 介导的线粒体自噬及细胞器互作机制[J]. 生物化学与生物物理进展,2021,48(11):1253-1259. doi:10.16476/j.pibb.2020.0392.

(编辑:贺绍梅)