doi:10.11659/jjssx.05E022079

·基础研究·

miR-298 通过靶向结合 CHN1 抑制胃腺癌细胞增殖

江莉平[1],刘伍星[2],马梦云[1],司 琳[1],夏 飞[3] (1.洪湖市人民医院肿瘤血液内科,湖北 洪湖 433200;2.洪湖市人民医院康复科,湖北 洪湖 433200;3.江汉大学附属湖北省第三人民医院药学部,湖北 武汉 430033)

[摘 要] **目的** 探讨 miR-298 靶向结合 α-嵌合蛋白(CHN1)对胃腺癌细胞增殖的影响及潜在作用机制。**方法** 采用生物信息学分析 CHN1 在胃腺癌中的表达及其与临床表型的关系、miR-298 与 CHN1 的靶向关系,并通过双荧光素酶报告实验验证 miR-298 对靶基因 CHN1 的直接靶向调控作用。通过细胞转染构建稳定敲低 CHN1 的 SGC-7901 和 BGC-823 细胞系,利用 CCK-8、克隆形成实验、流式细胞术、LDH 释放检测、体内移植瘤实验、免疫组化、qRT-PCR、Western-blot 实验检测 CHN1 低表达对胃腺癌 SGC-7901、BGC-823 细胞增殖、凋亡及细胞周期等的影响。**结果** CHN1 在胃腺癌中高表达,且与 AJCC 临床分期、AJCC T 分期、分化程度、AJCC N 分期、AJCC M 分期、预后有关($P<0.05$),CHN1 高表达者的总生存率、无病生存率均低于 CHN1 低表达者($P<0.05$)。敲低 CHN1 表达后细胞 OD 值、克隆形成率、处于 G0/G1 期的细胞比例及 Ki67、CDK2、CCNB1、BCL2 蛋白表达水平均下降($P<0.05$),处于 S 期的细胞比例、LDH 释放、细胞凋亡率、BAX 蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。敲低 CHN1 的小鼠瘤体体积、质量及 CHN1 蛋白表达水平下降($P<0.05$)。miR-298 能靶向 CHN1 影响胃腺癌细胞增殖、克隆形成率、处于 G0/G1 期的细胞比例、Ki67 蛋白表达水平($P<0.05$)。**结论** miR-298 在胃腺癌中低表达,其可能通过靶向结合 CHN1 影响胃腺癌细胞周期,抑制癌细胞的增殖,并促进其凋亡,可为胃腺癌的诊断及治疗提供参考。

[关键词] 胃腺癌;miR-298;α-嵌合蛋白;细胞增殖;细胞周期

[中图分类号] R735.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-05-18

miR-298 inhibiting the proliferation of gastric adenocarcinoma cells by targeting CHN1

JIANG Li-ping[1], LIU Wu-xing[2], MA Meng-yun[1], SI Lin[1], XIA Fei[3] (1. Department of Oncology and Hematology, Honghu People's Hospital, Honghu Hubei 433200, China; 2. Department of Rehabilitation, Honghu People's Hospital, Honghu Hubei 433200, China; 3. Department of Pharmacy, Hubei Third People's Hospital Affiliated to Jianghan University, Wuhan Hubei 430033, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of miR-298 targeting α-chimaerin 1 (CHN1) on the proliferation of gastric adenocarcinoma cells and its potential mechanism. **Methods** The expression of CHN1 in gastric adenocarcinoma and its relationship with clinical

[基金项目] 湖北省卫生健康委员会科研项目(WJ2019F170)

[通信作者] 江莉平,E-mail:jiangliping8935@163.com

[14] 陈云郁,徐 裕,汪芳军,等.利培酮联合丙戊酸钠对感染性脑炎致精神障碍患者 MOAS 和 PAN-SS 评分的影响[J].中华医院感染学杂志,2018,28(11):1666-1669.doi:10.11816/cn.ni.2018-171774.

[15] Fakhoury M. Revisiting the serotonin hypothesis:implications for major depressive disorders[J]. Mol Neurobiol,2016,53(5):2778-2786. doi:10.1007/s12035-015-9152-z.

[16] 杨 琴,梁 枫,李正姐,等.鸡豆黄素 A 对围绝经期抑郁症大鼠的神经保护作用及机制研究[J].安徽医科大学学报,2019,54(1):15-20. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.004.

[17] Mccormick C, Rosenthal CR, Miller TD, et al. Hippocampal damage increases deontological responses during moral decision making[J]. J Neurosci,2016,36(48):12157-12167. doi:10.1523/JNEUROSCI.0707-16.2016.

[18] Yu C, Bai YX, Xu XP, et al. Behavioral abnormality along with NMDAR-related CREB suppression in rat hippocampus after shortwave exposure[J]. Biomed Environ Sci,2019,32(3):189-198. doi:10.3967/bes2019.026.

[19] Mondal AC, Fatima M. Direct and indirect evidences of BDNF and NGF as key modulators in depression:role of antidepressants treatment [J]. Int J Neurosci,2019,129(3):283-296. doi:10.1080/00207454.2018.1527328.

[20] Matsuo J, Haga S, Hashimoto K, et al. Activation of caspase-3 during chlamydia trachomatis-induced apoptosis at a late stage[J]. Can J Microbiol,2019,65(2):135-143. doi:10.1139/cjm-2018-0408.

[21] Khalilzadeh B, Shadjou N, Kanberoglu GS, et al. Advances in nanomaterial based optical biosensing and bioimaging of apoptosis via caspase-3 activity:a review[J]. Mikrochim Acta,2018,185(9):434. doi:10.1007/s00604-018-2980-6.

[22] Huang Y, Fu Z, Dong W, et al. Serum starvation-induces down-regulation of Bcl-2/Bax confers apoptosis in tongue coating-related cells in vitro[J]. Mol Med Rep,2018,17(4):5057-5064. doi:10.3892/mmr.2018.8512.

[23] 傅增辉,金 艳,林再红,等.白桦脂醇对慢性应激抑郁模型大鼠行为及神经营养因子表达的影响[J].解剖学杂志,2020,43(3):200-205.doi:10.3969/j.issn.1001-1633.2020.03.005.

(编辑:贺绍梅)

phenotypes, and the targeted relationship between miR-298 and CHN1 were analyzed by bioinformatics. The direct regulation effect of miR-298 on target gene CHN1 was verified by dual luciferase report assay. The SGC-7901 and BGC-823 cell lines with stable knocking-down of CHN1 were constructed by cells transfection, the effects of low-expression of CHN1 on the proliferation, apoptosis and cycle of gastric adenocarcinoma cells SGC-7901 and BGC-823 were detected by CCK-8, clone formation assay, flow cytometry, LDH release test, in vivo tumor assay, immunohistochemistry, qRT-PCR and Western-blot. **Results** The expression of CHN1 was up-regulated in gastric adenocarcinoma, which was correlated with the clinical staging of AJCC, T staging of AJCC, differentiation degree, N staging of AJCC, M staging of AJCC and prognosis ($P<0.05$). The overall survival rate and disease-free survival rate in patients with high expression of CHN1 were lower than those with low expression of CHN1 ($P<0.05$). After knocking down the expression of CHN1, the OD value, clone formation rate, proportion of cells in G0/G1 phase, and the expression levels of Ki67, CDK2, CCNB1 and BCL2 proteins were decreased ($P<0.05$), while the proportion of cells in S phase, LDH release, apoptosis rate and expression level of BAX protein were increased ($P<0.05$). The tumor volume and mass, and expression level of CHN1 protein were decreased in rats after knocking down CHN1 ($P<0.05$). The miR-298 could affect the proliferation of gastric adenocarcinoma cells, clone formation rate, proportion of cells in G0/G1 phase and expression level of Ki67 protein by targeting CHN1 ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of miR-298 is down-regulated in gastric adenocarcinoma. It may affect the cycle of gastric adenocarcinoma cells, inhibit cells proliferation and promote apoptosis by targeting CHN1, which can provide reference for the diagnosis and treatment of gastric adenocarcinoma.

Keywords: gastric adenocarcinoma; miR-298; α-chimaerin 1; cell proliferation; cell cycle

胃癌是全球范围内较常见的消化道恶性肿瘤之一,由于其早期无典型症状,多数患者就诊时已处于中晚期,错过了最佳的治疗时机,导致生存率较低[1-2]。流行病学报告显示,随着胃癌相关基础及临床研究的不断深入,我国胃癌的发生率及病死率均有所下降,但仍处于较高的水平,且胃癌的转移率和复发率较高,患者预后较差[3-4]。近年来有学者发现,α-嵌合蛋白(α-chimaerin 1,CHN1)基因可能在肿瘤的形成等过程中发挥重要作用,但研究仍处于起步阶段[5]。微小 RNA(microRNA,miRNA)是一种参与基因转录后调控的非编码单链 RNA 分子,通常在真核生物中检测到,可通过调控多种靶基因的表达水平参与肿瘤形成等过程,已被证实与肿瘤的发生发展过程密切相关[6]。有研究表明,miR-298 可调控肝癌[7]、肺癌[8]、卵巢癌[9]等多种肿瘤细胞的增殖和侵袭,然而目前关于 miR-298 对胃腺癌细胞的影响尚不明确,且尚无 miR-298 与 CHN1 在胃腺癌中相互作用的研究。基于此,本研究初步探讨了 miR-298 靶向 CHN1 对胃腺癌细胞增殖、凋亡的影响及潜在作用机制,以期为阐明胃腺癌发展及转移的相关机制及寻找新药靶点提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人胃腺癌细胞系 SGC-7901、BGC-823 购自中国科学院(上海)生物化学与细胞生物学研究所。DMEM 培养液、10% FBS、PBS 等购自美国 Gibco 公司;TRIzol 试剂、Lipofectamine™2000 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)释放检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;β-actin、CHN1、Ki67、CDK2、CCNB1、BCL2、BAX 一抗购自英国 Abcam 公司;PVDF 膜、ECL 化学发光显色液购自美国 Millipore 公司。

1.2 细胞培养

将人胃腺癌细胞系 SGC-7901、BGC-823 复苏后置于 37 ℃、5% CO_2 的恒温培养箱中进行常规培养,取对数生长期细胞用于后续实验。

1.3 生物信息学分析

从 TCGA 数据库(http://www.cancergenome.nih.gov/)中下载胃腺癌的 TCGA_STAD 表达矩阵和临床信息,以中位数进行分组,将胃癌患者分为 CHN1 高表达组和 CHN1 低表达组,利用 TCGA 数据库分析 CHN1 在胃腺癌中的表达及其与临床表型的关系。从 GEO 数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)中下载基因表达谱公共数据集 GSE54397,分析 miR-298 在胃腺癌中的表达水平。运用 RNAhybrid 数据库(https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid)预测 miR-298 与 CHN1 的靶向关系,评估 miR-298 与 CHN1 3'-UTR 的互补性。

1.4 细胞转染实验

1.4.1 CHN1 低表达和干扰细胞的构建 取对数生长期细胞接种于 6 孔板,细胞密度达 70% ~ 80% 时,根据 Lipofectamine™2000 试剂盒说明书以 shCHN1 1#(shCHN1 1#组)、shCHN1 2#(shCHN1 2#组)及阴性对照慢病毒载体 shNC(shNC 组)转染细胞,空白对照

组细胞不转染质粒。转染完成后采用嘌呤霉素筛选出稳定敲低 CHN1 的 SGC-7901 和 BGC-823 细胞系。

1.4.2 miR-298 转染及 CHN1 共转染 根据 Lipofectamine™2000 试剂盒说明书分别转染 miR-298 模拟物(miR-298 组)、阴性对照慢病毒载体 miR-NC(miR-NC 组)及 miR-298 模拟物 + CHN1 高表达质粒共转染体系(miR-298 + CHN1 组)。

1.5 CCK-8 实验

调整各组细胞浓度为 2×10^4/L,并接种于 96 孔板,无菌 PBS 填充边缘孔,在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中常规静置培养。于接种 0 d、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 向每孔滴加 10 μL CCK-8 工作液,继续培养 4 h 后采用 DNM-9606 型酶标分析仪(北京朗普新技术有限公司)检测 450 nm 波长处的吸光度(OD)值,绘制生长曲线。

1.6 克隆形成实验检测

将各组细胞制成单细胞悬液,以 500 个/皿的密度接种至含 10 mL 37 ℃预温培养液的培养皿中,均匀分散细胞后常规静置培养。观察到肉眼可见的克隆时停止培养。弃去培养皿中的上清培养液后,用 PBS 清洗 2 次,以 1∶3的比例加入醋酸/甲醇溶液固定 15 min 后,弃固定液,用 Gimsa 染色 20 min,于流水下缓慢清洗染色液,计数克隆细胞。克隆形成率(%) = 克隆数/接种细胞数 ×100%。

1.7 流式细胞术检测细胞周期

将各组细胞浓度调整为 1×10^6/mL,并接种至 6 孔板,常规静置培养 48 h,再置入离心管中,以 1 000 r/min于 4 ℃离心 5 min 后收集细胞,PBS 洗涤,加入 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(美国 AAT Bioquest 公司)中的缓冲液混匀,再加入 PI、RNase A 混合,4 ℃避光孵育 30 min,采用 FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)进行检测分析。

1.8 LDH 释放检测试剂盒检测细胞毒性

调整各组细胞浓度为 2×10^4/L,并接种至 96 孔板中,无菌 PBS 填充边缘孔,在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中常规静置培养 23 h 后加入 LDH 释放试剂,反复吹打混匀,继续孵育 1 h 后常温下以 1 000 r/min 离心 5 min,收集各组上清液,参照试剂盒说明书检测 LDH 释放量。

1.9 体内移植瘤实验

取对数生长期低表达 CHN1 稳定转染 SGC-7901 细胞株(shCHN1 1#组)及阴性对照 SGC-7901 细胞株(shNC 组),制成单细胞悬液,于裸小鼠右腋下注射,每次注射 1×10^6 个活细胞,建立荷瘤小鼠模型,每组接种 5 只裸鼠。保持温度、光照节律不变,自由饮食、饮水。观察 0 d、2 d、4 d、6 d、8 d、10 d、12 d、14 d 固定时间下裸鼠移植瘤生长情况,在肉眼观察到瘤体形成后,每 2 d 用游标卡尺测量皮下移植瘤体积并绘制肿瘤生长曲线。14 d 后处死小鼠,取出肿瘤,称重固定,然后用于免疫组化实验。

1.10 免疫组化实验

取各组小鼠瘤体组织,常规制成切片,脱蜡、水化后以枸橼酸钠抗原修复,3% H_2O_2 去除内源性过氧化物酶,血清封闭,加入 CHN1 一抗(1∶250),4 ℃冰箱过夜,PBS 清洗 3 次,滴加 HRP 标记的二抗(1∶250),室温孵育 20 min,PBS 清洗 3 次,滴加 DAB 显色,显微镜下控制显色,苏木素复染,1% 盐酸酒精分化,自来水冲洗返蓝,梯度乙醇脱水后吹干,中性树胶封片。显微镜下随机选择 5 个高倍(×400)视野,统计阳性着色细胞占比,以细胞核呈棕黄色为 CHN1 阳性表达。

1.11 双荧光素酶报告实验

运用双荧光素酶报告分析 CHN1 与 miR-298 的靶向关系。根据靶基因预测软件预测的可能结合位点,设计合成该位点的 DNA 片段(CHN1 WT)及该位点突变体的 DNA 片段(CHN1 MUT),退火后克隆至双荧光素酶启动子载体中。将合成的包含有 CHN1 WT 及 CHN1 MUT 的质粒与 miR-298 共转染至 SGC-7901 细胞,孵育 48 h 后弃去培养基,采用荧光素酶检测试剂盒检测细胞荧光素酶活性。

1.12 qRT-PCR 实验

采用 qRT-PCR 法检测人胃腺癌细胞 SGC-7901、BGC-823 中 CHN1 mRNA 的表达水平。TRIzol 法提取总 RNA,按照反转录试剂盒说明书反转录得到 cDNA,采用 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 Thermofisher)完成 PCR 扩增,PCR 反应条件:95 ℃、5 min,95 ℃、30 s,65 ℃、30 s,72 ℃、30 s,共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 1 min。以 GAPDH 作为标准内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 CHN1 的相对表达进行定量。引物序列如下:CHN1-F,5'-GGAGCTACCTCATCCGGGAG-3';CHN1-R,5'-TGTGTCTCTTTCAGGACTGGCA-3';GAPDH-F,5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3';GAPDH-R,5'-GACTGAGTACCTGAACCGGC-3'。

1.13 Western blot 实验

将各组细胞培养 48 h 后,提取总蛋白,Bradford 调节蛋白浓度。经 SDS-PAGE 凝胶电泳、电转膜至 PVDF 膜,密封 2 h,添加 β-actin、CHN1、Ki67、CDK2、CCNB1、BCL2、BAX 一抗 4 ℃孵育过夜,用 TBST 漂洗 40 min,

加入 HRP 标记的二抗孵育 1 h,TBST 漂洗 40 min,ECL 发光液显色,暗室曝光。各组蛋白条带灰度值采用 Imaging System 软件分析,标准内参为 β-actin,计算各蛋白的相对灰度值。

1.14 统计学方法

采用 GraphPad Prism 和 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行至少 3 个独立检验,多组间比较采用单因素方差分析,2 组间比较采用独立样本 t 检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。。

2 结果

2.1 CHN1 在胃腺癌中的表达情况及其与临床表型的关系

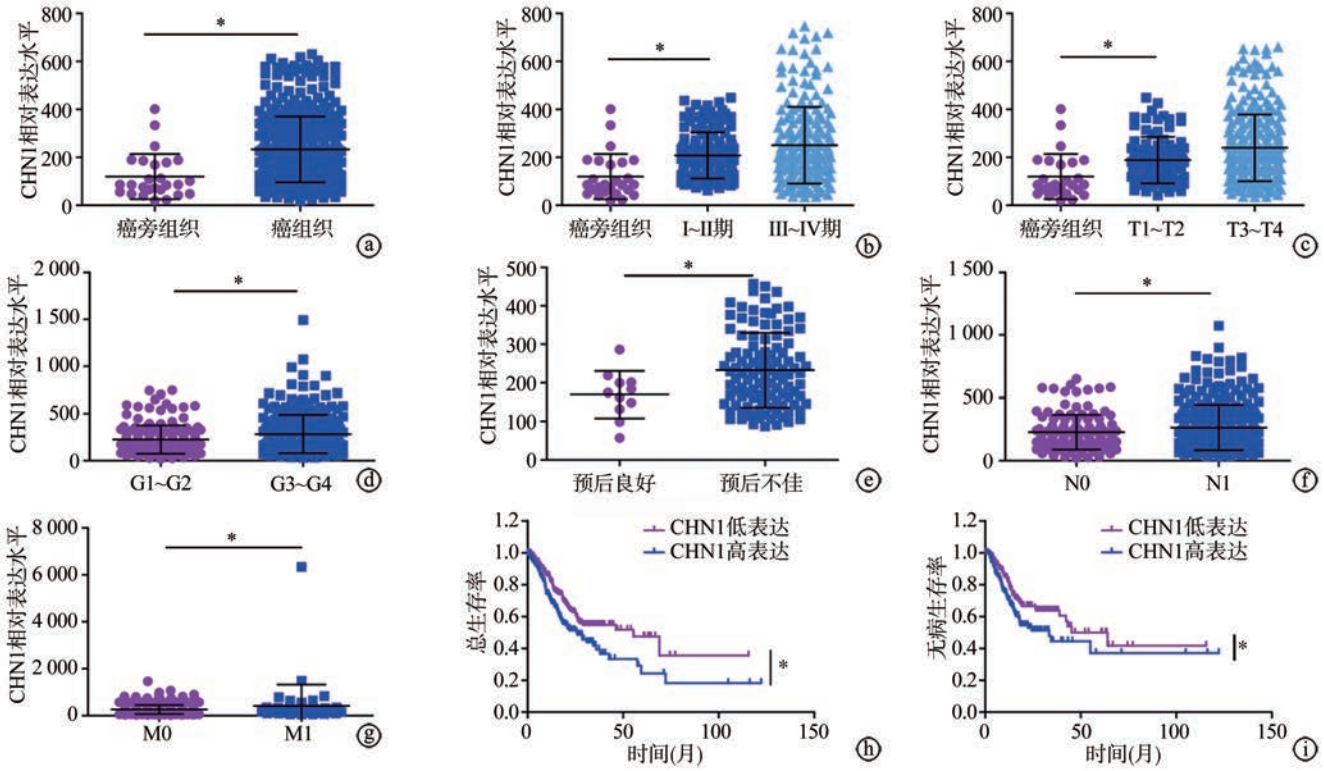
采用 TCGA 数据库分析 CHN1 在胃腺癌中的表达情况及其与临床表型的关系,结果显示,CHN1 在胃腺癌组织中高表达($P < 0.05$),其表达水平与美国癌症联合会(American Joint Committee on Cancer,AJCC)临床分期、AJCC T 分期、分化程度、AJCC N 分期、AJCC M 分期、预后有关($P < 0.05$),且 CHN1 高表达者的总生存率、无病生存率均低于 CHN1 低表达者($P < 0.05$),见图 1。

2.2 CHN1 低表达对胃腺癌细胞增殖及细胞周期的影响

与 shNC 组相比,shCHN1 1#组和 shCHN1 2#组 SGC-7901 和 BGC-823 细胞 CHN1 蛋白表达、OD 值、克隆形成率、处于 G0/G1 期的细胞比例均明显下降($P < 0.05$),处于 S 期的细胞比例明显上升($P < 0.05$),处于 G2/M 期的细胞比例无显著变化($P > 0.05$),Ki67、CDK2、CCNB1 蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$),见图 2。以上结果提示 CHN1 低表达能抑制胃腺癌细胞增殖,并影响细胞周期。

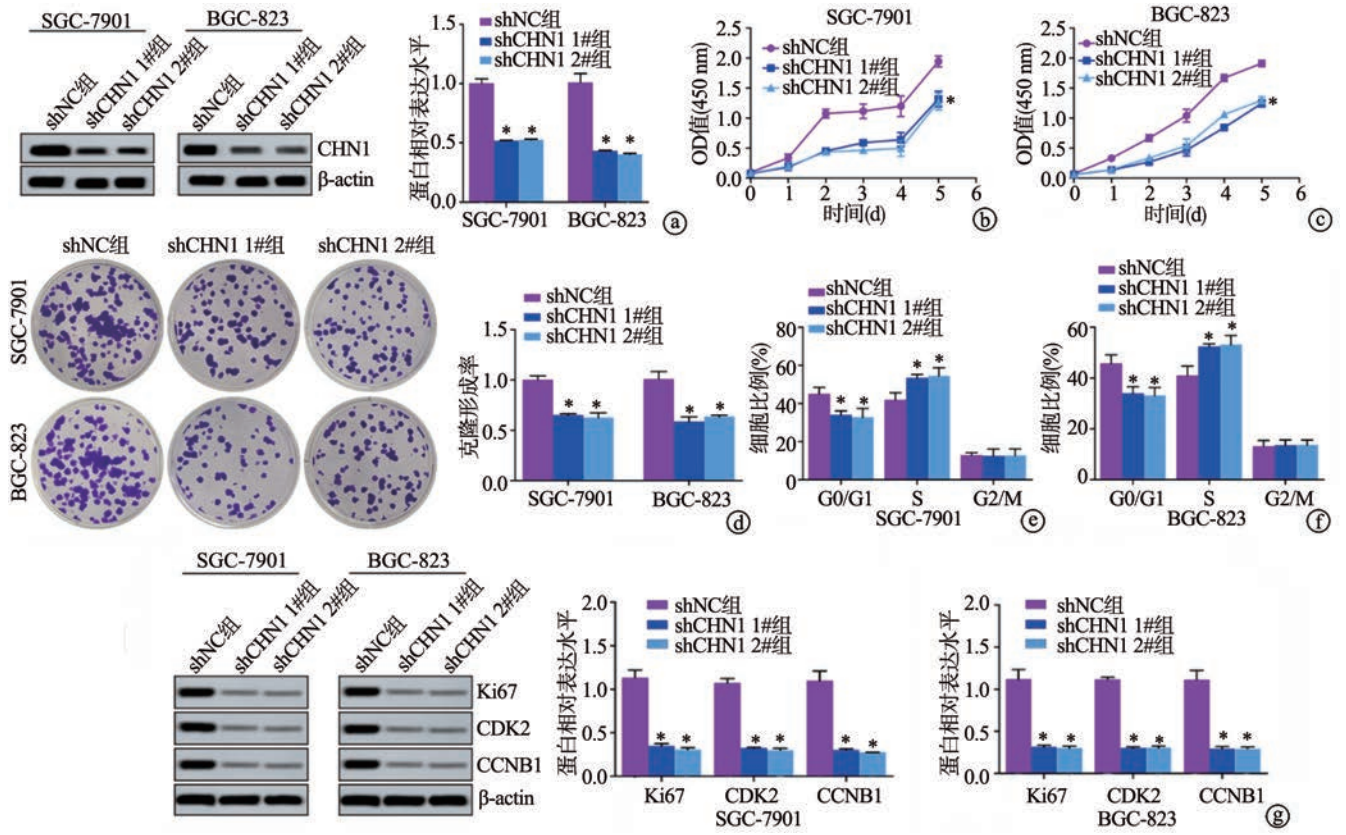
2.3 CHN1 低表达对胃腺癌细胞凋亡的影响

与 shNC 组相比,shCHN1 1#组和 shCHN1 2#组 SGC-7901 和 BGC-823 细胞的 LDH 释放、细胞凋亡率均明显升高($P < 0.05$),BCL2 蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$),BAX 蛋白表达水平明显上升($P < 0.05$),见图 3。以上结果提示 CHN1 低表达能促进胃腺癌细胞凋亡。



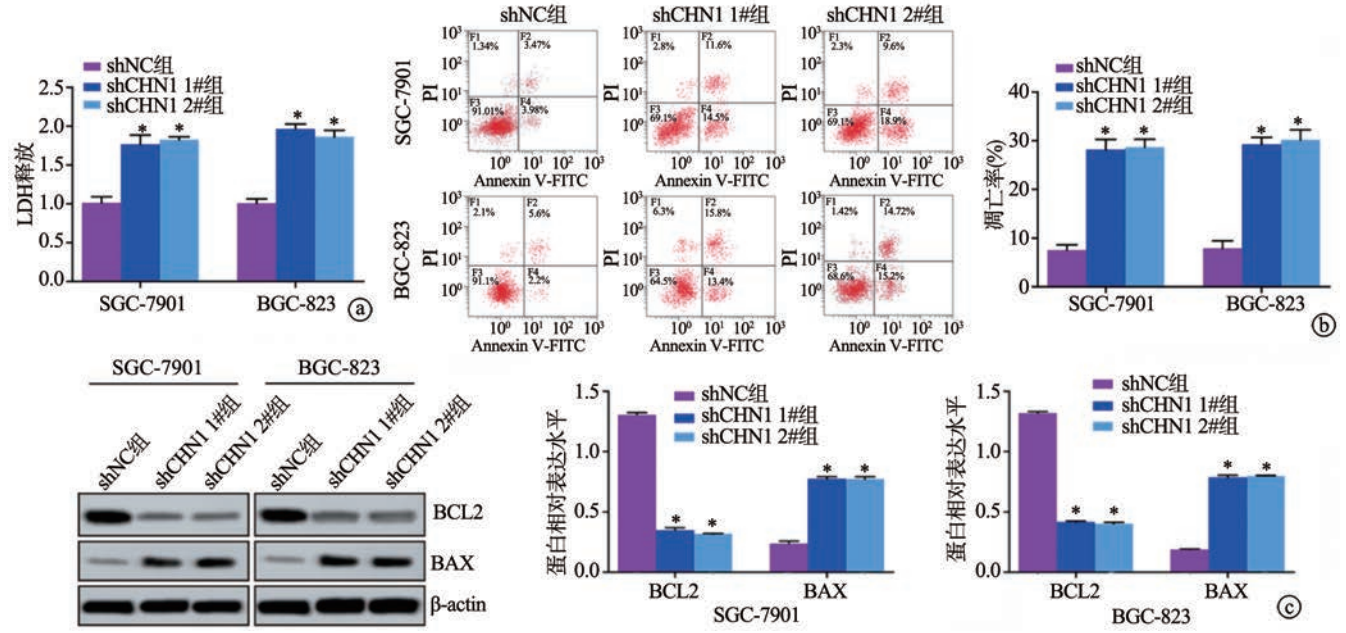
a:CHN1 在胃腺癌及癌旁组织中的表达;b:CHN1 在不同临床分期患者中的表达 c:CHN1 在不同 AJCC T 分期患者中的表达;d:CHN1在不同分化程度患者中的表达;e:CHN1 在不同预后患者中的表达;f:CHN1 在不同 AJCC N 分期患者中的表达;g:CHN1 在不同 AJCC M 分期患者中的表达;h:CHN1 高、低表达患者的总生存率;i:CHN1 高、低表达患者的无病生存率 *:$P < 0.05$

图 1 CHN1 在胃腺癌中的表达及其与临床表型的关系



a:Western blot 检测 CHN1 蛋白表达;b、c:CCK-8 检测细胞活力;d:克隆形成实验检测细胞增殖能力;e、f:流式细胞术检测细胞周期;g:Western blot 检测细胞周期相关蛋白的表达水平　　*:与 shNC 组相比,$P<0.05$

图 2　CHN1 低表达对胃腺癌细胞增殖及细胞周期的影响



a:细胞毒性检测;b:细胞凋亡检测;c:凋亡相关蛋白表达水平检测　　*:与 shNC 组相比,$P<0.05$

图 3　CHN1 低表达对胃腺癌细胞凋亡的影响

2.4　CHN1 低表达对裸鼠成瘤能力的影响

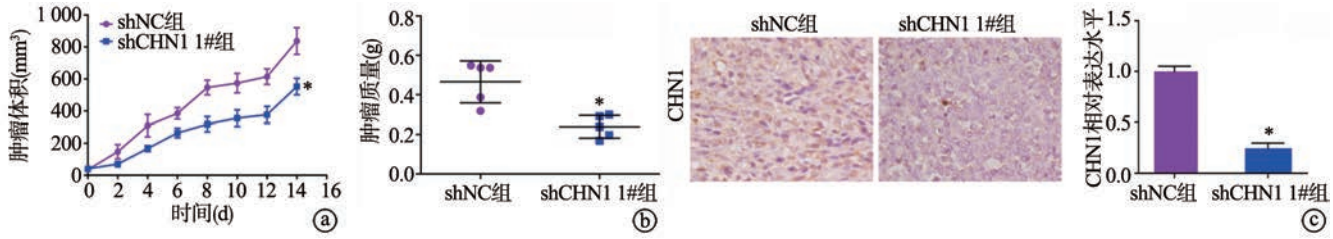
与 shNC 组相比,shCHN1 1#组小鼠的瘤体体积、质量明显下降($P<0.05$),小鼠瘤体组织中的 CHN1 蛋白表达水平明显下降($P<0.05$),见图 4。提示 CHN1 低表达在体内抑制胃腺癌细胞增殖。

2.5 miR-298 靶向负调控 CHN1 的表达

与癌旁组织相比,miR-298 在胃腺癌中低表达($P<0.05$)。运用 RNAhybrid 数据库分析发现,miR-298与 CHN1 存在靶向结合位点;荧光素酶报告结果显示,CHN1-MUT 组的荧光素酶活性无显著变化,而 CHN1-WT 组的荧光素酶活性显著降低,表明结合位点的突变使得 miR-298 与 CHN1 的靶向调控作用消失。与 miR-NC 组相比,miR-298 组 SGC-7901 和 BGC-823 细胞 CHN1 mRNA 及蛋白表达水平明显下降($P<0.05$),见图 5。提示 miR-298 在胃腺癌中低表达,且其能靶向负调控 CHN1 的表达。

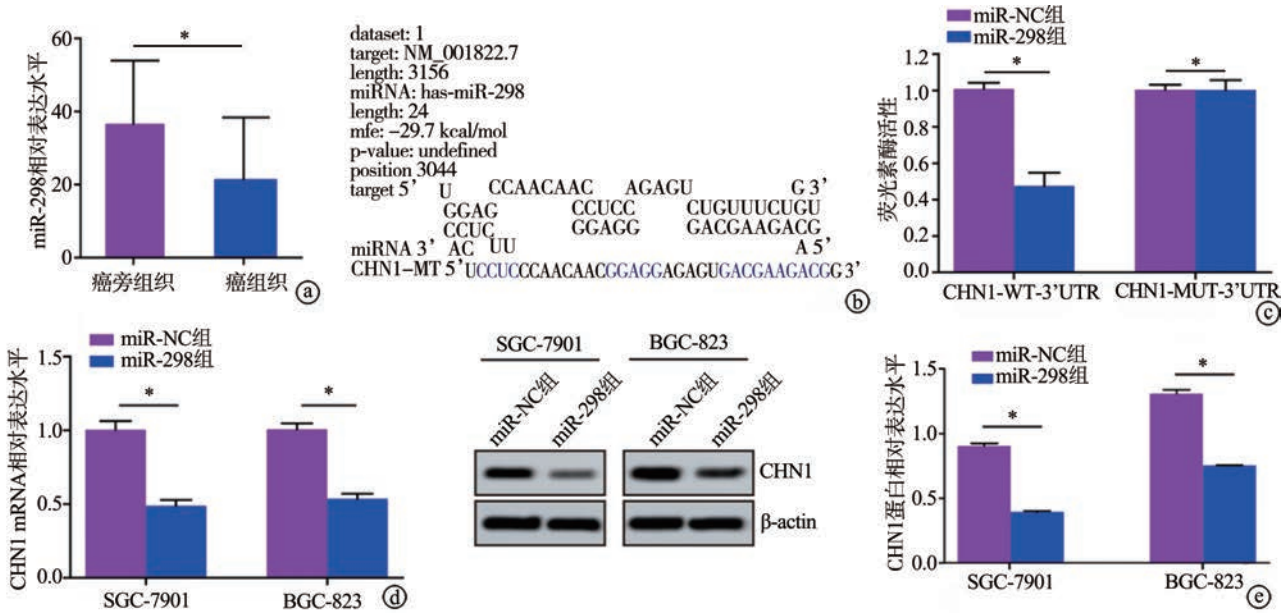
2.6 miR-298 靶向负调控 CHN1 的表达抑制胃腺癌细胞增殖

与 miR-NC 组相比,miR-298 组 SGC-7901 和 BGC-823 细胞 CHN1 蛋白表达、OD 值、克隆形成率均明显下降($P<0.05$),处于 G0/G1 期的细胞比例明显下降($P<0.05$),处于 S 期的细胞比例明显上升($P<0.05$),处于 G2/M 期的细胞比例无显著变化($P>0.05$),Ki67 蛋白表达水平明显下降($P<0.05$);而与 miR-NC 组相比,miR-298 + CHN1 组上述指标无明显变化($P<0.05$),见图 6。提示 miR-298 可通过靶向负调控 CHN1 的表达抑制胃腺癌细胞增殖。



a~b:CHN1 低表达对裸鼠瘤体体积、质量的影响;c:免疫组化法检测瘤体中 CHN1 蛋白表达(×400) *:与 shNC 组相比,$P<0.05$

图 4 CHN1 低表达对裸鼠成瘤能力的影响

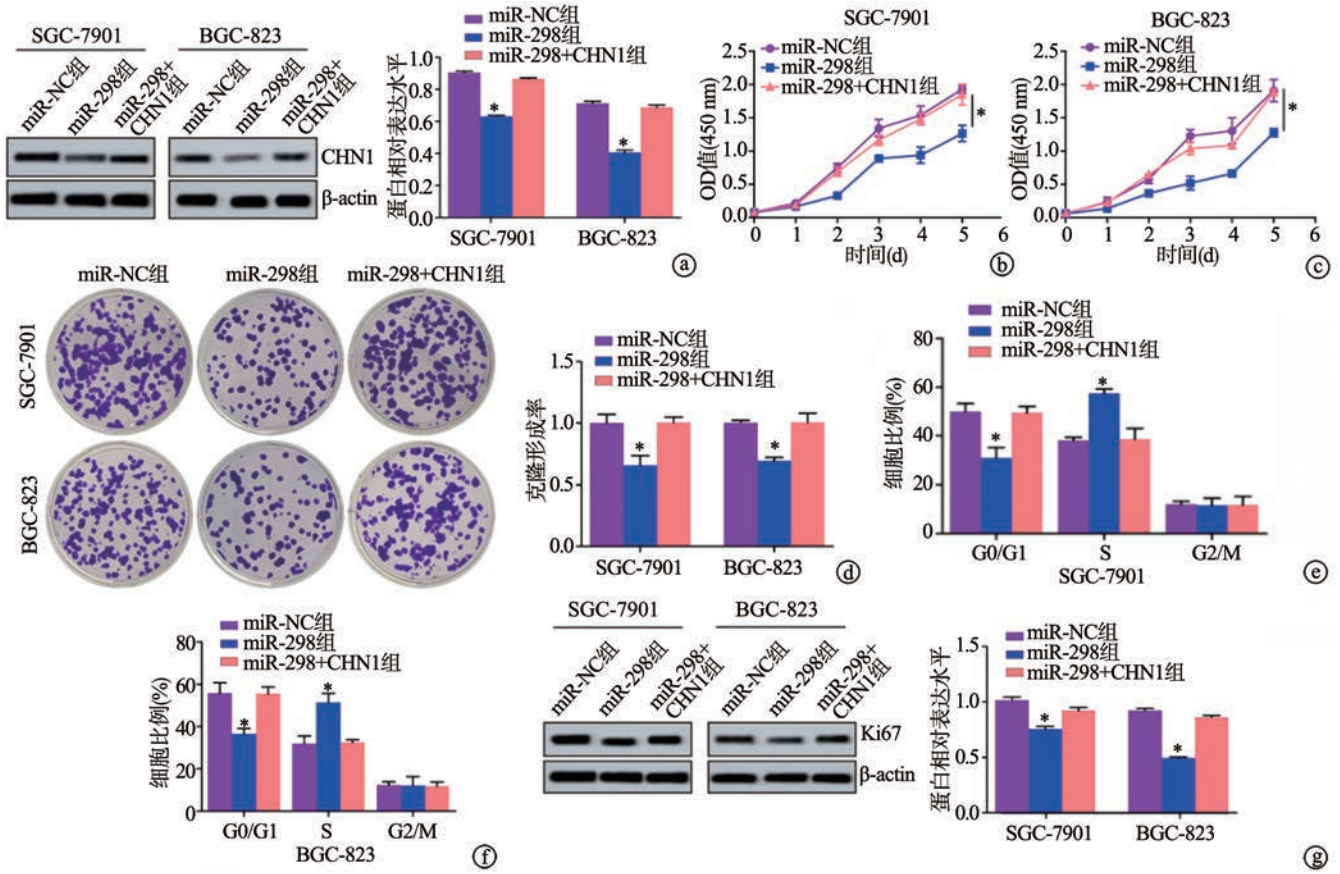


a、b:生物信息学分析 miR-298 在胃腺癌中的表达水平及 miR-298 与 CHN1 的靶向关系;c:双荧光素酶报告实验验证 miR-298 与 CHN1 的靶向关系;d:qRT-PCR 检测 CHN1 mRNA 相对表达水平;e:Western blot 检测 CHN1 蛋白表达水平 *:$P<0.05$

图 5 miR-298 靶向负调控 CHN1 的表达

3 讨论

CHN1 位于人类 2 号染色体的 q31-32.1 区域,其可编码一种 GTP 酶激活蛋白,该蛋白能够与 GDP 或 GTP 结合[10]。目前,已有学者对 CHN1 开展系列研究,但多集中在神经生物学领域,如对脑部发育、神经信号传导、突触的发生机制等的影响,而 CHN1 对肿瘤发生发展过程的影响鲜有报道[11]。Zhao 等[12]研究显示,CHN1 在宫颈癌组织中高表达,且与宫颈癌患者的淋巴结转移状态及不良预后密切相关。Li 等[13]运用生物信息学技术分析发现,在胃癌患者中 CHN1 表达明显上调,且其高表达与患者的不良预后显著相关。本研究利用 TCGA 数据库分析 CHN1 在胃腺癌中的表达情况及其与临床表型的关系,结果显示,CHN1在胃



a:Western blot 检测 CHN1 蛋白表达水平;b、c:CCK-8 检测细胞活力;d:克隆形成实验检测细胞增殖能力;e、f:流式细胞术检测 SGC-7901 和 BGC-823 细胞周期;g:Western blot 检测细胞周期相关蛋白表达水平 *:与 miR-NC 组相比,$P<0.05$

图 6 miR-298 靶向负调控 CHN1 的表达抑制胃腺癌细胞增殖

腺癌中高表达,其表达水平与 AJCC 临床分期、AJCC T 分期、分化程度、AJCC N 分期、AJCC M 分期、预后有关,且 CHN1 高表达者的总生存率、无病生存率均低于 CHN1 低表达者,同时,本研究在胃腺癌细胞系 SGC-7901、BGC-823 中证实,CHN1 低表达可导致细胞的增殖活力及克隆形成率明显下降,LDH 释放更加明显,且细胞周期阻滞于 S 期,提示 CHN1 在胃腺癌的发生发展过程具有重要作用。

Ki67 是一种与有丝分裂密切相关的核抗原,在细胞增殖中不可或缺,可作为检测细胞增殖能力的重要指标[14]。CDK2、CCNB1 则是机体内研究发现调控细胞周期的两类蛋白,CDK2 主要参与细胞 G1 期向 S 期转变的过程;CCNB1 主要通过和 CDKs 结合后,促进细胞的 G2/M 期转变[15-16]。BCL2 在细胞凋亡过程中起关键作用,能抑制细胞凋亡;BAX 则主要发挥促凋亡作用,两者在细胞内表达比例的失衡与细胞凋亡密切相关[17]。本研究结果显示,CHN1 表达下调后,Ki67、CDK2、CCNB1、BCL2 蛋白表达水平明显下降,BAX 蛋白表达水平明显上升,进一步证实了 CHN1 低表达对胃腺癌细胞系 SGC-7901、BGC-823 的增殖活性具有抑制作用。本研究裸鼠体内成瘤实验结果显示,抑制 CHN1 表达后,移植瘤的生长受到抑制,且 CHN1 蛋白表达明显下降,提示 CHN1 在胃腺癌的发生发展过程中具有重要作用,CHN1 低表达在体内也能抑制胃腺癌细胞生长。

miR-298 位于人类 20 号染色体的 q13-32 区域,近年来国内外相关研究均发现其与恶性肿瘤的发生发展密切相关[18-19]。Arabsorkhi 等[20]研究显示,结肠癌患者肿瘤组织及血浆中的 miR-298 表达水平异常,且与患者的 TNM 分期、肿瘤分化程度及淋巴结转移密切相关,miR-298 的异常表达是导致患者预后不良的重要因素之一,故认为 miR-298 可能是结肠癌的治疗靶点。Li 等[21]研究显示,miR-298 在甲状腺癌组织中表达下调,且 miR-298 过表达可显著增加 BAX 和 caspase-3 蛋白表达水平,降低 BCL2 蛋白表达水平,还能抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。本研究也发现,miR-298 在胃腺癌中呈低表达。miR-298 靶基因的鉴定具有重要意义,能帮助理解 miR-298 在胃腺癌发生发展过程中的

作用,确定新的治疗靶点。本研究利用生物信息学技术分析发现,CHN1 是 miR-298 的下游靶基因,双荧光素酶实验结果亦证实了 miR-298 可直接靶向作用于 CHN1,二者存在负调控关系。为进一步分析 miR-298 靶向调控 CHN1 表达对胃腺癌细胞增殖的影响,本研究进行相关实验发现,与 miR-NC 组相比,miR-298 组细胞增殖能力明显受到抑制,而 miR-298 + CHN1 组则无明显变化,证实了 miR-298 可通过靶向负调控 CHN1 的表达抑制胃腺癌细胞增殖。

综上所述,miR-298 在胃腺癌中低表达,其可能通过靶向结合 CHN1 影响胃腺癌细胞周期,抑制细胞增殖,并促进其凋亡。

[参考文献]

[1] 徐 艳,曹 冰,沈小星,等. 抑制素 βA(INHβA)在胃癌中过表达的临床病理意义[J]. 空军医学杂志,2021,37(2):133 - 137. doi:10.3969/j.issn.2095 - 3402.2021.02.012.

[2] 谈 理,杨洪光,郑 波,等. HER-2、PGⅡ及 Sema4 D 蛋白在胃癌中的表达及与病情、预后的关系[J]. 临床误诊误治,2022,35(5):48 - 51. doi:10.3969/j.issn.1002 - 3429.2022.05.015.

[3] 曹毛毛,李 贺,孙殿钦,等. 2000-2019 年中国胃癌流行病学趋势分析[J]. 中华消化外科杂志,2021,20(1):102 - 109. doi:10.3760/cma.j.cn115610 - 20201130 - 00746.

[4] 王 竞,赵亚男,文 欢,等. circ_0001946 靶向 miR-1270/Cyclin T2 轴调控胃癌细胞恶性表型的分子机制研究[J]. 解放军医药杂志,2021,33(9):22 - 30. doi:10.3969/j.issn.2095 - 140X.2021.09.005.

[5] Liu J, Li Y, Chen X, et al. Upregulation of miR-205 induces CHN1 expression, which is associated with the aggressive behaviour of cervical cancer cells and correlated with lymph node metastasis[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 1029. doi: 10.1186/s12885 - 020 - 07478 - w.

[6] 李祥坤,肖光军,陈 姝,等. 上皮性卵巢癌患者血清 miR-203、miR-137、miR-222-3p 表达及意义[J]. 分子诊断与治疗杂志,2022,14(3):392 - 396. doi:10.3969/j.issn.1674 - 6929.2022.03.009.

[7] Mo Y, He L, Lai Z, et al. LINC01287/miR-298/STAT3 feedback loop regulates growth and the epithelial-to-mesenchymal transition phenotype in hepatocellular carcinoma cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 149. doi: 10.1186/s13046 - 018 - 0831 - 2.

[8] Zhang Z, Lin W, Lin Y, et al. Long intergenic non-coding RNALinc00485 promotes lung cancer progression by modulating miR-298/c-Myc axis[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(1): 309 - 322. doi: 10.1111/jcmm.16036.

[9] Zhou F, Chen J, Wang H. MicroRNA-298 inhibits malignant phenotypes of epithelial ovarian cancer by regulating the expression of EZH2[J]. Oncol Lett, 2016, 12(5): 3926 - 3932. doi: 10.3892/ol.2016.5204.

[10] Liang J, Li Y, Chen L, et al. Correction to: systemic microvascular rarefaction is correlated with dysfunction of late endothelial progenitor cells in mild hypertension: a substudy of EXCAVATION-CHN1[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 26. doi: 10.1186/s12967 - 020 - 02216 - z.

[11] Angelini C, Trimouille A, Arveiler B, et al. CHN1 and duane retraction syndrome: expanding the phenotype to cranial nerves development disease[J]. Eur J Med Genet, 2021, 64(4): 104188. doi: 10.1016/j.ejmg.2021.104188.

[12] Zhao H, Wang L, Wang S, et al. CHN1 promotes epithelial-mesenchymal transition via the Akt/GSK-3β/snail pathway in cervical carcinoma[J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 295. doi: 10.1186/s12967 - 021 - 02963 - 7.

[13] Li JP, Zeng SH, Zhang YH, et al. Bioinformatics-based analysis of the association between the A1-chimaerin (CHN1) gene and gastric cancer[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 2874 - 2889. doi: 10.1080/21655979.2021.1940621.

[14] Min KW, Kim DH, Son BK, et al. A high Ki67/BCL2 index could predict lower disease-free and overall survival in intestinal-type gastric cancer[J]. Eur Surg Res, 2017, 58(3/4): 158 - 168. doi: 10.1159/000448945.

[15] Ogata R, Kishino E, Saitoh W, et al. Resistance to cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 inhibitors confers cross-resistance to other CDK inhibitors but not to chemotherapeutic agents in breast cancer cells[J]. Breast Cancer, 2021, 28(1): 206 - 215. doi: 10.1007/s12282 - 020 - 01150 - 8.

[16] Lok SW, Whittle JR, Vaillant F, et al. A phase Ib dose-escalation and expansion study of the BCL2 inhibitor venetoclax combined with tamoxifen in ER and BCL2-positive metastatic breast cancer[J]. Cancer Discov, 2019, 9(3): 354 - 369. doi: 10.1158/2159 - 8290.

[17] Keyvanloo Shahrestanaki M, Bagheri M, Ghanadian M, et al. Centaurea cyanus extracted 13-O-acetylsolstitialin A decrease Bax/Bcl-2 ratio and expression of cyclin D1/Cdk-4 to induceapoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10): 18309 - 18319. doi: 10.1002/jcb.29141.

[18] Sun H, Zhong D, Wang C, et al. MiR-298 exacerbates ischemia/reperfusion injury following ischemic stroke by targeting Act1[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 48(2): 528 - 539. doi: 10.1159/000491810.

[19] Cao N, Mu L, Yang W, et al. MicroRNA-298 represses hepatocellular carcinoma progression by inhibiting CTNND1-mediated Wnt/β-catenin signaling[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 483 - 490. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.135.

[20] Arabsorkhi Z, Gharib E, Yaghmoorian Khojini J, et al. miR-298 plays a pivotal role in colon cancer invasiveness by targeting PTEN[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(5): 4335 - 4350. doi: 10.1002/jcp.29310.

[21] Li X, Liu C, Zhao X, et al. Effects of CDK6 regulated by miR-298 on proliferation and apoptosis of thyroid cancer cells[J]. Oncol Lett, 2020, 19(4): 2909 - 2915. doi: 10.3892/ol.2020.11398.

(编辑:龙小芬)