



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.026

http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.026

Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(4):600-603.

· 简要论著 ·

miR-137与胃癌侵袭能力的关系研究

徐丽伟¹, 漆靖², 卢太亮², 廖国庆², 丁杰³

(1. 浙江省肿瘤医院 胸部肿瘤外科, 浙江 杭州 310022; 2. 中南大学湘雅医院 胃肠外科, 湖南 长沙 410008; 3. 贵州省人民医院 胃肠外科, 贵州 贵阳 550002)

摘要

目的: 探讨胃癌组织 miR-137 的表达及其与胃癌细胞侵袭能力间的关系。

方法: 用 qRT-PCR 检测胃癌组织与癌旁组织 miR-137 的表达, 分析 miR-137 表达与胃癌临床病理特征的关系; 分别用 qRT-PCR 与 Transwell 侵袭实验检测 3 种胃癌细胞 (AGS、SGC7901、BGC823) 及正常胃黏膜细胞 (GES1) miR-137 的表达与穿膜。

结果: 胃癌组织中 miR-137 表达量明显低于癌旁组织 ($P<0.05$), miR-137 表达与胃癌患者 T 分期有关, T 分期越高 miR-137 表达量越低 ($P<0.05$); 各胃癌细胞 miR-137 表达量均低于正常胃黏膜细胞, 且胃癌细胞侵袭力越强胃癌细胞 miR-137 表达量越低 ($P<0.05$); 穿膜细胞数与 miR-137 表达量之间呈明显负相关 ($r=-0.8881$, $P<0.05$)。

结论: 胃癌组织 miR-137 表达降低, 且 miR-137 表达量越低提示胃癌细胞侵袭能力越强。

关键词

胃肿瘤; 微 RNAs; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.2

microRNA (miRNA) 是一种内源性非编码 RNA, 广泛存在于植物、微生物、动物体内, 在细胞内具有多种重要的调节作用^[1-2]。经生物信息学方法预测, 人类基因组中大约有 1/3 的基因表达受到 miRNA 调控。miR-137 位于人类 1 号染色体短臂 2 区 2 带, 据报道 miR-137 的异常表达可能与肿瘤发生有关, 研究主要集中于中枢神经系统肿瘤和消化系统肿瘤, 包括胶质母细胞瘤^[3-8], 成神经细胞瘤^[9], 星形细胞瘤^[10], 少突神经胶质^[11], 胃癌^[12], 结直肠癌^[13-21], 乳腺癌^[22-24], 黑素瘤^[25-26], 肺癌^[27], 头颈部鳞状细胞癌^[28], 舌癌^[29], 嗜铬细胞瘤和副神经节瘤^[30], 子宫内膜癌^[31]。miR-137 过表达可以调控下游基因, 抑制肿瘤细胞的增殖、迁移, 参与多个信号通路, 且 miR-137 与肿瘤化学治疗耐药有关。本实验利用 qRT-PCR 及 Transwell 实验技术在组织与细胞水平分析 miR-137 表达量与胃癌细胞侵袭能力之间的关系。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81302169)。

收稿日期: 2014-11-20; **修订日期:** 2015-03-14。

作者简介: 徐丽伟, 浙江省肿瘤医院住院医师, 主要从事肿瘤外科学方面的研究。

通信作者: 廖国庆, Email: 114887806@qq.com

1 材料与方法

1.1 实验标本

收集 2012 年 6 月—2013 年 1 月于中南大学湘雅医院行手术切除的胃癌及距病变边缘 4 cm 的癌旁标本 24 对, 液氮保存。通过电子病历系统查询患者性别、年龄、分期、病理结果情况。按国际抗癌联盟 (UICC) 的 TNM 标准^[32], 确定病理分期及分化程度, 患者术前未实施辅助化疗, 均签署了知情同意书。

1.2 实验细胞与材料

胃癌细胞株 AGS、SGC7901、BGC823 及人胚胃上皮细胞 GES1, 均购自中南大学湘雅医学院细胞研究中心。miR-137 引物序列 (F: 5'-TTA TTG CTT AAG AAT ACG CGT AG-3'; R: 5'-TGG TGT CGT GGA GTC G-3')、U6 内参引物序列 (F: 5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3'; R: 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3') 交由上海吉玛制药技术公司合成。

1.3 主要试剂

miRNeasy Mini Kit 购买于 Qiagen 公司; miRNA Q-PCR Detection Kit 购买于 GeneCopoeia 公司; 脱氧核糖核酸酶 I、核糖核酸酶抑制剂均购

买于Fermentas公司;SYBR GreenPCR Master Mix 购买于ABI公司。

1.4 实验方法

1.4.1 qRT-PCR 检测 (1) RNA 提取与标本处理: 取约 100 mg 组织,液氮研磨,胰酶消化收集,每样本加入 QIAzol 700 μ L 混匀;萃取 RNA: 加入 140 μ L 氯仿,震荡 15 s,室温放置 2 min,4 $^{\circ}$ C 下离心,12 000 r/min,约 15 min;沉淀 RNA: 取上层水相,加 500 μ L 无水乙醇,混匀,以核酸纯化柱收集样本,室温下,10 000 r/min,离心 15 s,弃去穿流液,重复此步骤 1 次,以 Buffer RWT,10 000 r/min,15 s,洗柱 1 次,以 Buffer RPE,10 000 r/min,15 s,洗柱 1 次,以 Buffer RPE 干燥内膜,以去 RNA 酶水溶解 RNA。(2) 采用 A_{260}/A_{280} 法测定 RNA 纯度及浓度。(3) 琼脂糖电泳检测 RNA 完整性。(4) 去除基因组 DNA。(5) PolyA 标记及反转录: 按以说明书配比,短暂离心后在 37 $^{\circ}$ C 反应 60 min,结束后行 85 $^{\circ}$ C 灭活酶 5 min,反转录产物 cDNA 以灭菌水稀释 5~10 倍备用。(6) qPCR 扩增: 按以说明书配置 qPCR 体系后进行扩增,扩增程序如下,预变性温度 95 $^{\circ}$ C,时间 5 min;PCR 反应: 变性(95 $^{\circ}$ C 10 s)、退火(60 $^{\circ}$ C 20 s)、延伸(72 $^{\circ}$ C 10 s),共 40 个循环。对于细胞实验,每实验组设置 3 个平行样本;对于每个细胞样本及组织样本,设 3 个平行孔。

1.4.2 Transwell 实验 以胰酶消化细胞,调节细胞密度,约 1×10^4 个细胞/mL。Transwell 上室接种细胞悬液约 2 mL,Transwell 下室加入含血清培养基,培养约 24 h。除去基质胶和上室内的细胞,酒精固定,苏木素染色,倒置显微镜观察计数,每实验组随机计数 3 个视野。

1.5 统计学处理

使用STATA 12.0统计软件进行统计学分析。连续数据进行组间均数比较采用t检验,相关性采用Spearman秩相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-137 在胃癌及癌旁组织中的表达

胃癌组织中 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 平均值为0.3291,癌旁组织中 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 平均值为0.838 9,胃癌组织中miR-137表达低于癌旁组织,两组间差异有统计学意义($t=-6.837$, $P<0.05$)(图1)。

2.2 miR-137 的表达与胃癌病理特征的关系

以T分期(以T₁+T₂、T₃+T₄为两分类)、N分

期、M分期、G分期、性别、年龄(以50岁为临界点分为两组)、HER-2免疫组织化学染色诊断结果为分组变量,以miR-137的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值为效应变量进行分析。结果发现T分期与miR-137相对表达有关,在T分期较晚的胃癌组织中miR-137相对表达量较低($P<0.05$)(表1)。

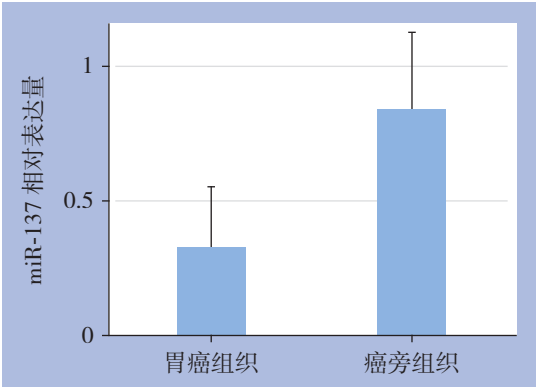


图1 胃癌组织及癌旁组织 miR-137 相对表达量比较

表1 miR-137 的表达与胃癌病理特征的关系

临床病理特征	n	miR-137/U6	
		H/F	P
T 分期			
T ₁ +T ₂	3	6.189	0.0129
T ₃ +T ₄	21		
N 分期			
N ₀	5	0.45	0.7221
N ₁	4		
N ₂	6		
N ₃	9		
M 分期			
M ₀	22	0.03	0.8609
M ₁	2		
分化程度			
高	1	3.437	0.1793
中	5		
低	18		
TNM 分期			
I	1	3.674	0.2989
II	5		
III	16		
IV	2		
HER-2			
阴性	18	0.111	0.7389
阳性	6		
性别			
男	15	0.556	0.4561
女	9		
年龄			
> 50	11	0.806	0.3692
≤ 50	13		

2.3 各组细胞 miR-137 表达情况

各组细胞miR-137相对表达量平均值 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 如下: GES1 4.631; AGS 2.649; SGC7901 1.976; BGC823 1.226, 各组间差异有统计学意义 ($F=24.90$, $P<0.05$)。正常胃黏膜GES1细胞miR-137表达量最高, 而高侵袭性的BGC823细胞miR-137表达量最低。

2.4 Transwell 侵袭实验结果

Transwell体外侵袭实验显示, 各组细胞株穿膜细胞数差异有统计学意义 ($F=331.91$, $P<0.05$), 高侵袭性的BGC823细胞穿过基质胶的细胞数明显多于其他细胞株 (图2)。

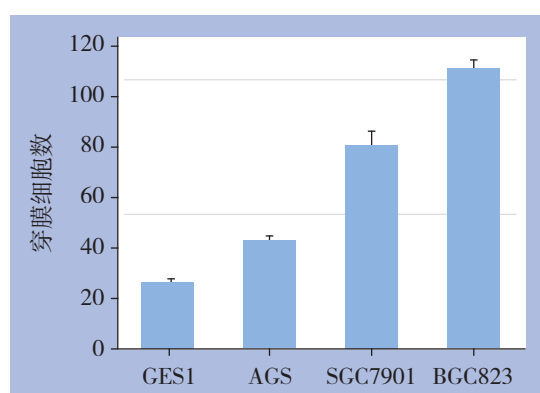


图2 各组细胞穿膜细胞数比较

2.5 miR-137 的表达与细胞侵袭性的相关性分析

经Spearman秩相关分析, 4株细胞穿膜细胞数与miR-137表达量之间均存在负相关关系 ($r=-0.8881$, $P<0.05$)。

3 讨论

实验发现miR-137在胃癌组织中表达降低, 且这种降低预示较晚的T分期。在体外实验中, miR-137与胃癌细胞侵袭能力相关, miR-137表达量越低, 胃癌细胞的侵袭性越高。造成这种现象的原因可能是miR-137调节下游靶基因表达, 间接调节了胃癌的侵袭能力。

miR-137可靶向作用于羧基末端结合蛋白1 (C-terminal-binding proteins 1, CtBP1), 转录辅抑制因子CtBP能与多种转录因子如Zeb1、Zeb2结合形成转录抑制复合体, Snail等转录因子通过与Zeb1结合后再结合于CtBP从而抑制肿瘤E-钙黏蛋白的表达^[33]。细胞间连接使上皮细胞形成有序的排列结构, 限制了上皮细胞的迁移能力。其中E-钙黏蛋白的作用非常重要, 它可介导黏附连

接, 维持上皮细胞极性并抑制细胞迁移能力^[34]。

此外, miR-137可通过调节金属基质蛋白酶相关通路影响肿瘤的侵袭转移能力。miR-137可通过抑制Akt和MAPK信号通路而降低MMP2、MMP9、VEGF在结肠癌细胞中的表达^[35-36], 抑制了结肠癌细胞的侵袭能力^[15]。而作为miR-137的靶基因Y-盒结合蛋白1 (Y-box binding protein-1, YB-1) 亦参与了肿瘤细胞侵袭转移过程, YB-1属Y-盒蛋白家族, 它可特异性地识别不同基因启动子区的反向CCAAT-box, 并与其结合, 调节基因转录。YB-1可以与AP2和p53相结合形成复合体, 随后绑定到MMP-2序列的增强子RE1上激活MMP-2的转录^[23]。

在胃癌组织中, miR-137表达降低, 且T分期较晚的胃癌组织中miR-137含量较低; 在胃癌细胞中, miR-137表达量与侵袭能力呈负相关。提示在胃癌中, miR-137的低表达预示着更高的侵袭能力。

参考文献

- [1] 秦麒麟, 李清龙. miRNA-122与肝细胞癌的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(1):105-109.
- [2] 周兴舰, 李红浪. MicroRNA功能异常与肿瘤浸润转移的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(5):602-606.
- [3] Bier A, Giladi N, Kronfeld N, et al. MicroRNA-137 is downregulated in glioblastoma and inhibits the stemness of glioma stem cells by targeting RTVP-1[J]. Oncotarget, 2013, 4(5):665-676.
- [4] Karsy M, Arslan E, Moy F. Current Progress on Understanding MicroRNAs in Glioblastoma Multiforme[J]. Genes Cancer, 2012, 3(1):3-15.
- [5] Sun J, Gong X, Purow B, et al. Uncovering MicroRNA and Transcription Factor Mediated Regulatory Networks in Glioblastoma[J]. PLoS Comput Biol, 2012, 8(7):e1002488. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002488.
- [6] Tunca B, Tezcan G, Cecener G, et al. Olea europaea leaf extract alters microRNA expression in human glioblastoma cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(11):1831-1844.
- [7] Chen L, Wang X, Wang H, et al. miR-137 is frequently downregulated in glioblastoma and is a negative regulator of Cox-2[J]. Eur J Cancer, 2012, 48(16):3104-3111.
- [8] Silber J, Lim DA, Petrutsch C, et al. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells[J]. BMC Med, 2008, 6:14. doi: 10.1186/1741-7015-6-14.
- [9] Althoff K, Beckers A, Odersky A, et al. MiR-137 functions as a tumor suppressor in neuroblastoma by downregulating KDM1A[J]. Int J Cancer, 2013, 133(5):1064-1073.

- [10] Zhi F, Chen X, Wang S, et al. The use of hsa-miR-21, hsa-miR-181b and hsa-miR-106a as prognostic indicators of astrocytoma[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(9):1640-1649.
- [11] Li KK, Yang L, Pang JC, et al. MIR-137 suppresses growth and invasion, is downregulated in oligodendroglial tumors and targets CSE1L[J]. *Brain Pathol*, 2013, 23(4):426-439.
- [12] Chen Q, Chen X, Zhang M, et al. miR-137 is frequently down-regulated in gastric cancer and is a negative regulator of Cdc42[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(7):2009-2016.
- [13] Qu J, Zhao L, Zhang P, et al. MicroRNA-195 chemosensitizes colon cancer cells to the chemotherapeutic drug doxorubicin by targeting the first binding site of BCL2L2 mRNA[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(3):535-545.
- [14] Chen DL, Wang DS, Wu WJ, et al. Overexpression of paxillin induced by miR-137 suppression promotes tumor progression and metastasis in colorectal cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(4):803-811.
- [15] Liang L, Li X, Zhang X, et al. MicroRNA-137, an HMGA1 target, suppresses colorectal cancer cell invasion and metastasis in mice by directly targeting FMNL2[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(3):624-635.
- [16] Sun Y, Zhao X, Zhou Y, et al. miR-124, miR-137 and miR-340 regulate colorectal cancer growth via inhibition of the Warburg effect[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(4):1346-1352.
- [17] Oberg AL, French AJ, Sarver AL, et al. miRNA expression in colon polyps provides evidence for a multihit model of colon cancer[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6):e20465. doi: 10.1371/journal.pone.0020465.
- [18] Necela BM, Carr JM, Asmann YW, et al. Differential expression of microRNAs in tumors from chronically inflamed or genetic (APC(Min/+)) models of colon cancer[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4):e18501. doi: 10.1371/journal.pone.0018501.
- [19] Liu M, Lang N, Qiu M, et al. miR-137 targets Cdc42 expression, induces cell cycle G1 arrest and inhibits invasion in colorectal cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(6):1269-1279.
- [20] Huang ZM, Yang J, Shen XY, et al. MicroRNA expression profile in non-cancerous colonic tissue associated with lymph node metastasis of colon cancer[J]. *J Dig Dis*, 2009, 10(3):188-194.
- [21] Svoboda M, Izakovicova HL, Sefr R, et al. Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer[J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(3):541-547.
- [22] Khoshnaw SM, Rakha EA, Abdel-Fatah T, et al. The microRNA maturation regulator Droshe is an independent predictor of outcome in breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 137(1):139-153.
- [23] Zhu X, Li Y, Shen H, et al. miR-137 restoration sensitizes multidrug-resistant MCF-7/ADM cells to anticancer agents by targeting YB-1[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013, 45(2):80-86.
- [24] Zhao Y, Li Y, Lou G, et al. MiR-137 targets estrogen-related receptor alpha and impairs the proliferative and migratory capacity of breast cancer cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):e39102. doi: 10.1371/journal.pone.0039102.
- [25] Luo C, Tetteh PW, Merz PR, et al. miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes[J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(3):768-775.
- [26] Chen X, Wang J, Shen H, et al. Epigenetics, microRNAs, and carcinogenesis: functional role of microRNA-137 in uveal melanoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(3):1193-1199.
- [27] Zhu X, Li Y, Shen H, et al. miR-137 inhibits the proliferation of lung cancer cells by targeting Cdc42 and Cdk6[J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(1):73-81.
- [28] Tu HF, Lin SC, Chang KW. MicroRNA aberrances in head and neck cancer: pathogenetic and clinical significance[J]. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2013, 21(2):104-111.
- [29] Wong TS, Liu XB, Wong BY, et al. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9):2588-2592.
- [30] de Cubas AA, Leandro-García LJ, Schiavi F, et al. Integrative analysis of miRNA and mRNA expression profiles in pheochromocytoma and paraganglioma identifies genotype-specific markers and potentially regulated pathways[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2013, 20(4):477-493.
- [31] Le XF, Merchant O, Bast RC, et al. The Roles of MicroRNAs in the Cancer Invasion-Metastasis Cascade[J]. *Cancer Microenviron*, 2010, 3(1):137-147.
- [32] Klöppel G, Rindi G, Perren A, et al. The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement[J]. *Virchows Arch*, 2010, 456(6):595-597.
- [33] Deng Y, Deng H, Bi F, et al. MicroRNA-137 targets carboxyl-terminal binding protein 1 in melanoma cell lines[J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(1):133-137.
- [34] Spizzo R, Nicoloso MS, Croce CM, et al. SnapShot: MicroRNAs in Cancer[J]. *Cell*, 2009, 137(3):586.
- [35] 王中欣. MMP-9和CD44v6在大肠癌中的表达及其临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(6):743-745.
- [36] 侯福涛, 陈子华, 钱立元. BMI-1和MMP-9在结肠癌细胞中的表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2010, 19(10):1103-1106.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 徐丽伟, 漆靖, 卢太亮, 等. miR-137与胃癌侵袭能力的关系研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(4):600-603. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.026

Cite this article as: XU LW, QI J, LU TL, et al. Study on relationship of miR-137 to invasiveness of gastric cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(4):600-603. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.026