



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.04.007
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2019.04.007
Chinese Journal of General Surgery, 2019, 28(4):423-432.

· 基础研究 ·

miR-105-5p 在胃癌中的表达及其意义与生物学功能

张雷¹, 王宇锋², 王亮², 韩少山², 殷国志², 鲜瑶³, 王林¹

(西安交通大学第一附属医院 1. 老年外科 2. 肝胆外科 3. 营养科, 陕西 西安 710061)

摘要

目的: 探讨 miR-105-5p 在胃癌 (GC) 中的表达情况、临床意义及生物学功能及其潜在的作用机制。

方法: 应用 real-time PCR 检测 miR-105-5p 在 GC 组织与癌旁组织以及不同 GC 细胞 (MGC-803, MKN-1, SGC-7901, BGC-823 和 AGS) 与正常胃黏膜细胞 (GES-1) 中的表达; 分析 miR-105-5p 的表达与 GC 临床病理特征及患者预后的关系; 采用 Transwell 迁移和侵袭实验以及 MTT 实验检测 miR-105-5p 对 GC 细胞迁移与侵袭能力以及增殖能力的影响; 应用生物信息学工具预测 miR-105-5p 的下游靶点, 并应用荧光素酶报告实验以及 Western blot 分析 miR-105-5p 对靶点的调节作用。

结果: miR-105-5p 在 GC 组织的表达明显高于癌旁组织, 在各 GC 细胞中的表达均明显高于正常胃黏膜细胞 (均 $P < 0.05$)。miR-105-5p 的表达水平与肿瘤大小 ($P = 0.020$) 和远处转移 ($P = 0.004$) 明显有关; miR-105-5p 低表达 GC 患者的总体生存率明显高于 miR-105-5p 高表达组的患者 ($P = 0.0018$)。选择 miR-105-5p 表达量相对较低的 BGC-823 细胞和相对较高的 MKN-1 细胞, 分别转染 miR-105-5p 模拟物和 miR-105-5p 抑制物, 转染后结果显示, BGC-823 细胞的迁移、侵袭和增殖能力明显增强, 而 MKN-1 细胞的迁移、侵袭和增殖能力明显抑制 (均 $P < 0.05$)。生物信息学分析发现, DIRAS 家族 GTP 结合 RAS 样 3 (DIRAS3) 可能是 miR-105-5p 的作用靶点; 荧光素酶报告实验显示, miR-105-5p 能够负向调节 DIRAS3-3'UTR 的荧光素酶活性; Western blot 显示, 转染 miR-105-5p 模拟物的 BGC-823 细胞中 DIRAS3 的表达明显下调, 转染 miR-105-5p 抑制物的 MKN-1 细胞 DIRAS3 的表达明显上调 (均 $P < 0.05$)。

结论: miR-105-5p 在 GC 中表达升高, 其可能通过靶向作用于 DIRAS3 增强 GC 细胞的迁移、侵袭及增殖, 进而促进 GC 的发生发展。

关键词

胃肿瘤; 微 RNAs; GTP 结合 RAS 样 3; 肿瘤浸润; 预后

中图分类号: R735.2

Expression of miR-105-5p in gastric cancer and its significance and biological function

ZHANG Lei¹, WANG Yufeng², WANG Liang², HAN Shaoshan², YIN Guozhi², XIAN Yao³, WANG Lin¹

(1. Department of Geriatric Surgery 2. Department of Hepatobiliary Surgery 3. Department of Nutrition, the First Affiliated Hospital of Xian Jiaotong University, Xi'an 710061)

Abstract

Objective: To investigate the expression, clinical significance and biological function of miR-105-5p in gastric

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划资助项目 (2017JM8002)。

收稿日期: 2019-01-01; **修订日期:** 2019-03-15。

作者简介: 张雷, 西安交通大学第一附属医院主治医师, 主要从事消化系统肿瘤方面的研究。

通信作者: 王林, Email: jiaodawanglin@163.com

cancer (GC), as well as its potential action mechanism.

Methods: The expressions of miR-105-5p in GC and tumor adjacent tissues as well as in different GC cell lines (MGC 803, MKN 1, SGC 7901, BGC 823 and AGS) and normal gastric mucosal cell line (GES-1) were determined by real-time PCR. The relations of miR-105-5p expression with the clinicopathologic features and prognosis of GC patients were analyzed. The effects of miR-105-5p on migration, invasion and proliferation of GC cells were examined by Transwell migration and invasion assay and MTT assay, respectively. The potential target gene for miR-105-5p was predicted by using Bioinformatics tools, and then, the correlation between miR-105-5p and its target gene was verified by Luciferase reporter assay and Western blot, respectively.

Results: The expression of miR-105-5p in GC tissues was significantly higher than that in tumor adjacent tissue, and in each studied GC cell line was significantly higher than that in normal gastric mucosal cell line (all $P < 0.05$). The expression of miR-105-5p was significantly associated with tumor size ($P = 0.020$) and distant metastasis ($P = 0.004$); the overall survival rate in GC patients with low miR-105-5p expression was significantly higher than that in GC patients with high miR-105-5p expression ($P = 0.0018$). The BGC-823 cells with a relatively low miR-105-5p expression and the MKN 1 cells with a relatively high miR-105-5p expression were transfected with miR-105-5p mimics and miR-105-5p inhibitors respectively, and the results after transfection showed that the migration, invasion and proliferative abilities in BGC-823 cells were significantly increased, while were significantly decreased in MKN 1 cells (all $P < 0.05$). Bioinformatics analysis suggested that DIRAS family GTPase 3 (DIRAS3) was possibly be the target of miR-105-5p; luciferase reporter assay indicated that the luciferase activity of DIRAS3-3'-UTR was negatively regulated by miR-105-5p; Western blot demonstrated that the DIRAS3 expression was significantly down-regulated in BGC-823 after transfection with miR-105-5p mimics, and was significantly up-regulated in MKN 1 cells after transfection with miR-105-5p inhibitors (both $P < 0.05$).

Conclusion: The expression of miR-105-5p is elevated in GC, promotes migration, which can enhance the migration, invasion and proliferative abilities of GC cells probably through targeting DIRAS3, and thereby promote the occurrence and development of GC.

Key words

Stomach Neoplasms; MicroRNAs; GTP-Binding RAS-Like 3; Neoplasm Invasiveness; Prognosis

CLC number: R735.2

胃癌 (gastric cancer, GC) 是最常见的恶性肿瘤之一, 具有较高的发病率和病死率, 严重威胁着人们的身心健康^[1-2]。由于大部分的 GC 在明确诊断时已处于中晚期, 并伴有肿瘤浸润或者淋巴结转移, 因此导致 GC 的治疗极为棘手^[2-4]。目前 GC 首选的治疗措施仍然是手术切除, 尽管近年来 GC 的诊治水平已经有了明显改善, 但是患者的总体预后仍然不容乐观^[2, 5-6]。因此寻找新的临床有效的 GC 诊治措施是目前最为迫切的任务之一。肿瘤靶向治疗是目前研究较为火热的领域之一, 而作为其中热点领域之一的微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类由内源基因编码的长度约为 18~25 个核苷酸序列的小分子 RNA, 其在肿瘤的发生发展过程中扮演着重要的角色^[7-9]。miRNA 主要通

过参与基因的转录后表达调控从而调节肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移等恶性生物学行为^[7, 10-11]。研究发现, miR-105-5p (既往被称为 miR-105) 与结直肠癌^[12]、肝癌^[13]、胶质瘤^[14]以及前列腺癌^[15]等恶性肿瘤的发生发展密切相关。例如, Shen 等^[12]发现结直肠癌中高表达的 miR-105-5p 对 TNF- α 介导的上皮间质转化发挥着重要作用; Shen 等^[13]研究发现 miR-105-5p 可以通过抑制 PI3K/Akt 信号通路从而抑制肝癌的生长。但是 miR-105-5p 在 GC 中的表达及作用目前罕有报道。因此, 本研究旨在探究 miR-105-5p 在 GC 中的表达情况、临床意义及其对 GC 细胞侵袭、迁移、增殖的影响, 并初步探讨其可能的作用机制, 为 GC 的预防和诊治提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 组织标本

收集并筛选 62 对 GC 组织和对应的癌旁组织标本,所有标本均来自 2009 年 1 月 1 日—2012 年 12 月 31 日在西安交通大学第一附属医院接受手术治疗并经术后病理诊断确诊的 GC 患者 62 例,其中男 43 例,女 19 例;年龄 24~78 岁,中位年龄 59 岁。所有患者术前均未接受放疗、化疗等其他辅助治疗。所有获得的新鲜组织取得后均尽快保存于液氮或者多聚甲醛(40 g/L)中。对术后 62 例患者进行随访,随访时间 3~60 个月。本研究获得西安交通大学第一附属医院伦理委员会审核批准并且获得患者知情同意。

1.2 主要试剂

TRIzol 试剂和脂质体(Lipofectamine™ 2000)均购自 Invitrogen 公司。胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司;DMEM 购自 ThermoFisher Scientific 公司;miRNA 逆转录试剂盒(All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit)、miRNA qPCR 试剂盒(All-in-One™ miRNA qPCR Kit)、miR-105-5p 特异性引物(货号:HmiRQP0025)、miRNA 内参 U6 引物(货号:HmiRQP9001)、miR-105-5p 模拟物(货号:HmiR0408-MR04)、miR-105-5p 抑制物(货号:HmiR-AN0024-AM02)均购自 Genecopoeia 公司;Transwell 小室购自 Becton Dickinson Labware 公司;Matrigel 基质胶购自 BD 公司;MTT 试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司;RIPA 裂解液(强)购自西安赫特生物科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗人 DIRAS3 多克隆抗体购自 Abcam 公司;小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;ECL 发光剂购自 Milipore 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与转染 人正常胃黏膜上皮细胞(GES-1)与胃癌细胞系(MGC-803, MKN-1, SGC-7901, BGC-823 和 AGS)均购自中科院上海生物化学与细胞生物学研究所。细胞培养液为含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液,恒温培养箱的条件为 5% CO₂、37 °C。细胞转染参照 Lipofectamine™ 2000 试剂说明书上的步骤进行。

首先将待转染细胞接种于 6 孔板中并培养至细胞融合度为 50%~70%。转染前 24 h,将正常血清更换为无双抗 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液。转染时,将 100 nmol miR-105-5p 模拟物与 100 nmol 阴性对照(miR-control)、以及 100 nmol miR-105-5p 抑制物与 100 nmol 阴性对照(anti-miR)用 Lipofectamine™ 2000 分别进行转染,用无双抗 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养 8 h 后换成正常培养液进行培养,后续转染效果检测及相关功能实验在转染 48 h 后收取细胞进行。

1.3.2 real-time PCR 实验 应用 TRIzol 试剂按照说明书上的步骤提取组织和细胞中的总 RNA,并应用超微量核酸定量光谱仪(Thermo Nanodrop 1000)测定 RNA 的浓度和纯度。逆转录操作分别按照 miRNA 逆转录试剂盒(All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit)和逆转录试剂盒(RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit)说明书上的步骤进行。MiRNA real-time PCR 按照 miRNA qPCR(All-in-One™ miRNA qPCR Kit)试剂盒说明书上的步骤进行,以 U6 为内参。结果均应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。独立重复实验 3 次。

1.3.3 Transwell 迁移和侵袭实验 Transwell 迁移实验时不铺胶;侵袭实验时,先按 1:6 的稀释比例将 50 mg/L 的 Matrigel 胶稀释后均匀铺于上层小室底部。将待测细胞消化、离心、重悬。在 Transwell 下层小室中加入 600 μ L 含 100 mL/L 胎牛血清的完全培养基,取各组细胞悬液 200 μ L(细胞数为 2×10^5)加入 Transwell 小室的上室。每组重复 3 次。24 h 后取出小室,首先用 PBS 溶液将小室清洗 3 次,然后用棉签将小室的微孔膜上层的 Matrigel 胶及细胞轻轻拭净,接着用 40 g/L 的多聚甲醛固定 20 min,用 1 g/L 的结晶紫染色 10 min,用 PBS 溶液洗净后将小室置于倒置显微镜下进行观察计数,每个样本随机选取 5 个视野进行计数并求其平均数,以此评估细胞的侵袭迁移能力。

1.3.4 MTT 实验 收集转染 24 h 后的各组细胞,调整细胞悬液的浓度,将细胞悬液接种至 96 孔板,使得每孔细胞数为 3×10^3 ,各组细胞分别设置 3 个复孔,继续培养。分别于接种 24、48、72 h 后弃去培养基,每孔加入 50 μ L 浓度为 5 g/L 的二苯基溴化四氮唑蓝(MTT)后继续孵育 4 h 后,每孔加入 200 μ L 二甲基亚砜(DMSO)进行终止。

然后应用光吸收酶标仪 (SpectraMax 190, 美谷分子仪器公司) 测定 490 nm 处的吸光度并进行分析。

1.3.5 细胞蛋白抽提及 Western blot 实验 细胞转染 48 h 后, 用 RIPA 裂解液抽提细胞总蛋白, 用 BCA 法进行蛋白定量。Western blot 实验时, 首先将待检测蛋白样品按 30 μg /孔上样后行 SDS-PAGE 电泳, 然后用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱牛奶粉液封闭 2.0 h 后, 加入相应的 DIRAS3 抗体 (1:1 000) 或者 β -actin 抗体 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日取出膜, 在室温孵育 30 min, 用 TBST 溶液 (TBS, 1 mL/L Tween-20) 洗膜 3 次, 10 min/次, 洗去残余的一抗; 分别加 HRP 标记的抗兔或抗小鼠二抗 (1:5 000), 室温孵育 2 h。TBST (TBS, 1 mL/L Tween-20) 洗膜 3 次, 10 min/次, 洗去残余的二抗后在暗室用 ECL 发光剂检测。

1.3.6 荧光素酶报告实验 设计合成 DIRAS3-3'-UTR 的野生序列和突变序列并进行扩增, 将扩增的片段分别转入 pMIR-reporterTM 的 miRNA 表达载体 (Applied Biosystems), 构建能够表达荧光素酶的重组质粒; 构建好的重组质粒分别与 miR-105-5p 模拟物或 miR-105-5p 抑制物共同转染至 293T 细胞, 72 h 后收集细胞, 严格按照 Luciferase

Reporter Gene Assay Kit 说明书操作实验。最后通过发光化学仪检测萤火虫和海肾荧光比值。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 20.0 等统计软件处理数据, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用的统计学方法包括单因素方差分析、*t* 检验、Pearson χ^2 检验、Kaplan-Meier 法、Spearman 相关性检验等; 用 Graphpad Prism 6 及 Adobe PhotoShop CS6 等软件进行图表的绘制。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-105-5p 在 GC 组织和细胞中表达情况

首先, 应用 real-time PCR 检测 62 对 GC 组织和对应的癌旁组织中 miR-105-5p 的表达水平。结果表明, miR-105-5p 在 GC 组织中相对表达水平明显高于癌旁组织 [(2.151 \pm 0.050) vs. (1.129 \pm 0.02), P<0.001] (图 1)。此外, 5 种 GC 细胞系 (MGC-803, MKN-1, SGC-7901, BGC-823 和 AGS) 中的 miR-105-5p 的表达水平均明显高于人正常胃黏膜上皮细胞 (GES-1) (均 P<0.001) (图 2)。

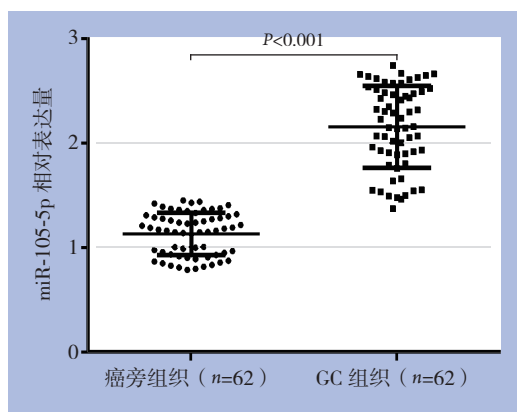


图 1 real-time PCR 检测 miR-105-5p 在 GC 组织和癌旁组织中的表达

Figure 1 The expressions of miR-105-5p in GC tissues and adjacent non-tumor tissues measured by real-time PCR

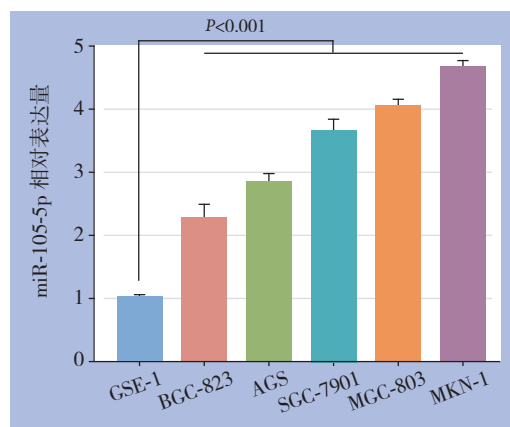


图 2 real-time PCR 检测 GC 细胞系与正常胃黏膜细胞中的 miR-105-5p 的表达

Figure 2 The expressions of miR-105-5p in GC cell lines and normal gastric mucosal cell line detected by real-time PCR

2.2 miR-105-5p 表达与 GC 临床病理因素及预后的关系

根据 miR-105-5p 在 GC 组织中的中位表达水平, 62 例 GC 患者被分为两组: miR-105-5p 高表

达组 ($n=31$) 和 miR-105-5p 低表达组 ($n=31$)。结果显示, miR-105-5p 与肿瘤大小 ($P=0.020$) 以及远处转移 ($P=0.004$) 明显有关, 而与年龄、性别等特征无明显关系 (均 $P>0.05$) (表 1)。

表 1 miR-105-5p 的表达水平与 GC 患者临床病理特征的关系 [n=62, n (%)]

Table 1 The relations of miR-105-5p expression with the clinicopathologic characteristics of GC patients [n=62, n (%)]

临床病理特征	n	高表达 (n=31)	低表达 (n=31)	χ^2	P
年龄 (岁)					
≥ 60	25	14 (56.0)	11 (44.0)	0.603	0.437
< 60	37	17 (45.9)	20 (54.1)		
性别					
男	43	19 (44.2)	24 (55.8)	1.897	0.168
女	19	12 (63.2)	7 (36.8)		
肿瘤大小 (cm)					
> 3	46	27 (58.7)	19 (41.3)	5.391	0.020
≤ 3	16	4 (25.0)	12 (75.0)		
TNM 分期					
I+II	23	9 (39.1)	14 (60.9)	1.728	0.189
III+IV	39	22 (56.4)	17 (43.6)		
淋巴结转移					
有	41	18 (43.9)	23 (56.1)	1.800	0.180
无	21	13 (61.9)	8 (38.1)		
远处转移					
有	16	13 (81.3)	3 (18.7)	8.424	0.004
无	46	18 (39.1)	28 (60.9)		

2.3 miR-105-5p 对 GC 细胞迁移和侵袭的影响

将 miR-105-5p 模拟物、miR-105-5p 抑制物分别转染至 BGC-823 和 MKN-1 细胞。real-time PCR 检测结果显示, miR-105-5p 模拟物能

Kaplan-Meier 法分析结果显示, miR-105-5p 低表达患者的总体生存率明显高于 miR-105-5p 高表达患者 (P=0.0018) (图 3)。

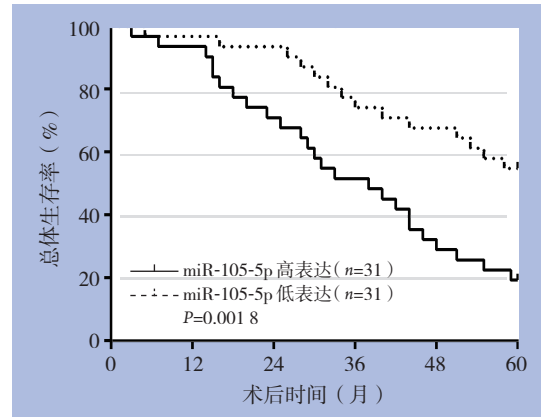


图 3 Kaplan-Meier 法分析 miR-105-5p 的表达水平对 GC 患者预后的影响

Figure 3 Influence of miR-105-5p expression on prognosis of GC patients analyzed by Kaplan-Meier method

够明显上调 BGC-823 细胞中 miR-105-5p 的表达水平 (P<0.001), 而 miR-105-5p 抑制物能够明显下调 MKN-1 细胞中 miR-105-5p 的表达水平 (P<0.001) (图 4)。

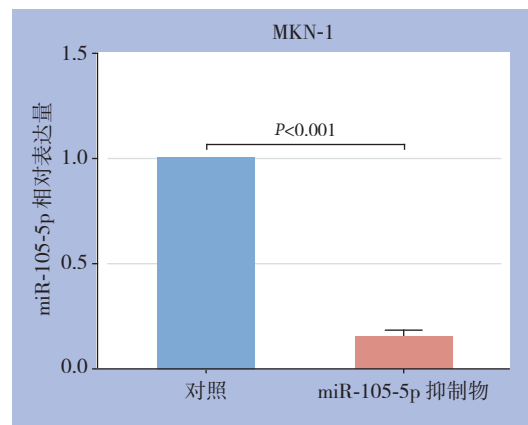
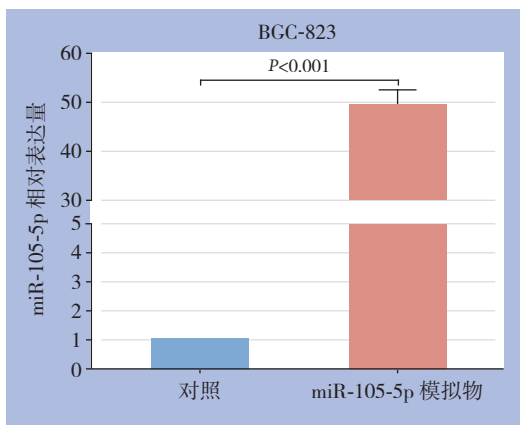


图 4 real-time PCR 检测 miR-105-5p 模拟物或者抑制物对 GC 细胞 miR-105-5p 表达的影响

Figure 4 Effect of miR-105-5p mimics or inhibitors on miR-105-5p expression in GC cells detected by real-time PCR

Transwell 迁移实验结果显示, 相较于对照组, miR-105-5p 模拟物能够明显促进 BGC-823 细胞穿过小室膜的数目 (P<0.01); 而转染 miR-105-5p 抑制物后的 MKN-1 细胞穿过小室膜的数目明显减少 (P<0.01) (图 5A)。Transwell 侵袭实验结

果显示, 与对照组相比, miR-105-5p 模拟物能明显促进 BGC-823 细胞穿过小室膜 (P<0.01), 而 miR-105-5p 抑制物能明显抑制 MKN-1 细胞穿过小室膜 (P<0.05) (图 5B)。

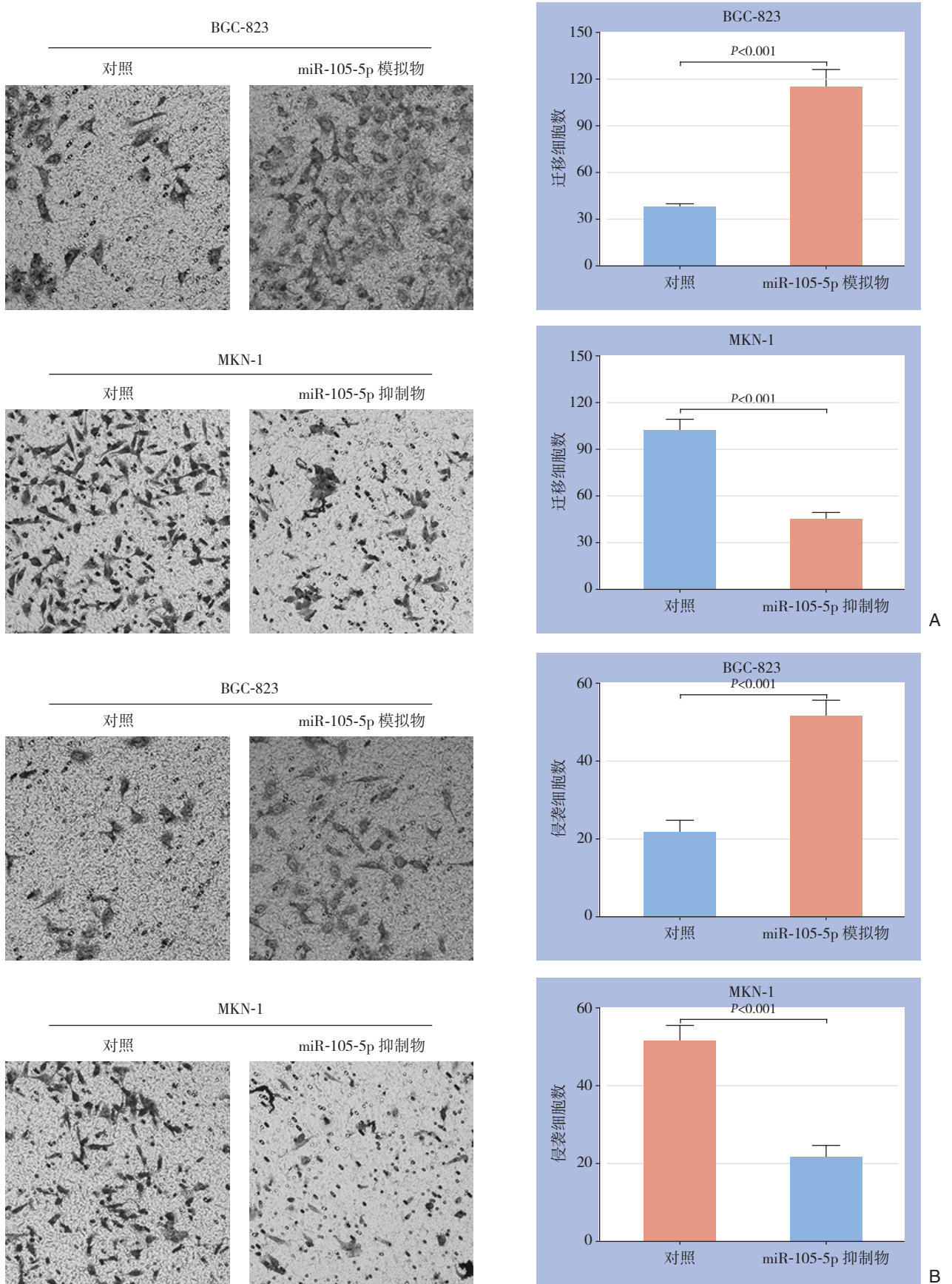


图 5 Transwell 实验检测 miR-105-5p 对 GC 细胞迁移、侵袭能力的影响 A: 迁移实验; B: 侵袭实验

Figure 5 Effect of miR-105-5p on migration and invasion GC cells examined by Transwell assay A: Migration analysis; B: Invasion analysis

2.4 miR-105-5p 对 GC 细胞增殖的影响

MTT 结果显示, 将 miR-105-5p 模拟物转染至 BGC-823 细胞 48 h 和 72 h 后, 细胞增殖能力明显

增强, 而转染 miR-105-5p 抑制物 48 h 和 72 h 后的 MKN-1 细胞的增殖能力被明显抑制 (图 6)。

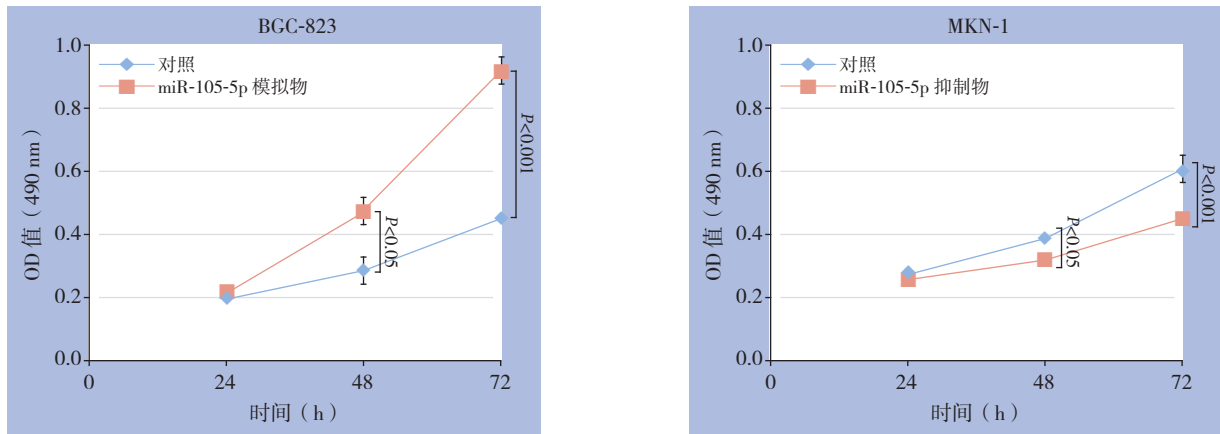


图 6 MTT 实验检测 miR-105-5p 表达对 GC 细胞增殖能力的影响
Figure 6 Effect of miR-105-5p expression on proliferative ability in GC cells examined by MTT

2.5 miR-105-5p 的靶基因分析

应用生物信息学软件 microRNA.org (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)、Targetscan (http://www.targetscan.org/vert_72) 和 miRBase (<http://www.mirbase.org>) 预测 miR-105-5p 的靶基因。如图 7A 所示, miR-105-5p 能够与 DIRAS 家族 GTP 结合 RAS 样 3 (DIRAS3) (DIRAS Family GTPase 3, DIRAS3) 的 3' 非编码区 (3'-UTR) 结合, 提示 DIRAS3 可能为

miR-105-5p 的靶基因。荧光素酶报告实验显示, miR-105-5p 能负向调节野生型的 DIRAS3-3'-UTR 荧光素酶的活性, 而对突变型的 DIRAS3-3'-UTR 的荧光素酶活性没有影响 (图 7B)。进一步研究发现, 与对照组比较, miR-105-5p 模拟物明显降低 DIRAS3 的蛋白水平 ($P < 0.001$), 而 miR-105-5p 抑制物明显上调 DIRAS3 的蛋白水平 ($P < 0.001$) (图 8)。

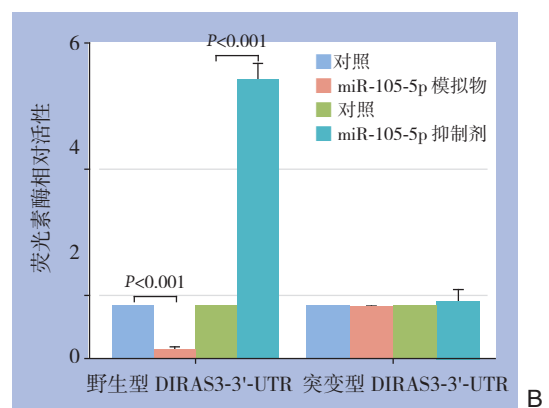
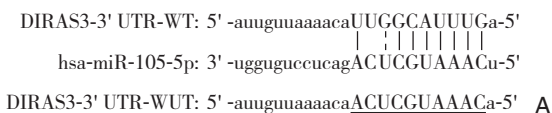


图 7 miR-105-5p 的靶基因预测 A: 生物信息学分析显示, miR-105-5p 可与野生型的 DIRAS3 的 3' 非编码区 (3'UTR) 结合 (WT: 野生型; MUT: 突变型); B: 荧光素酶报告实验显示, miR-105-5p 能负向调节野生型的 DIRAS3-3'-UTR 荧光素酶的活性, 而对突变型的 DIRAS3-3'-UTR 的荧光素酶活性没有影响

Figure 7 Prediction of the target gene of miR-105-5p A: Bioinformatics analysis suggesting that miR-105-5p can bind to 3' non-coding region of the wild-type DIRAS3 (WT: wild-type; MUT: mutant); B: Luciferase reporter assay indicating that miR-105-5p can negatively regulate the luciferase activity of the wild-type DIRAS3-3'-UTR and exerts no effect on the mutant type

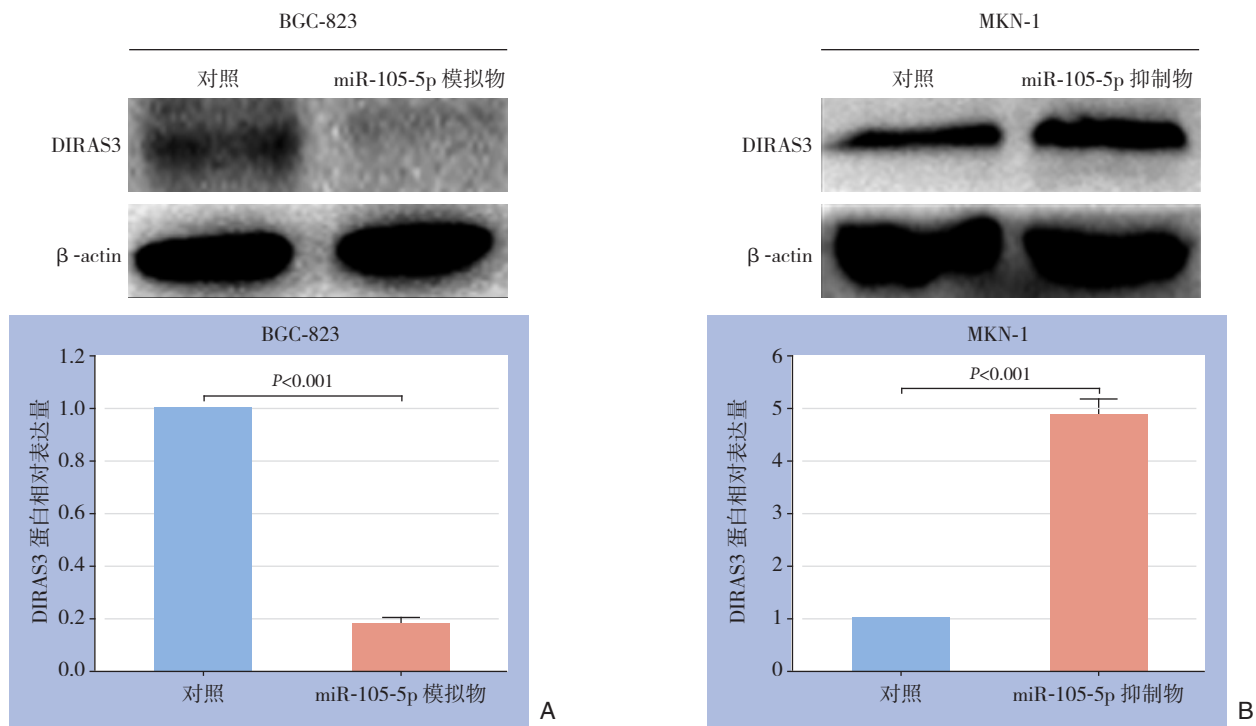


图 8 miR-105-5p 的靶基因验证 A: 转染 miR-105-5p 模拟物后, BGC-823 细胞中 DIRAS3 的表达水平明显下调; B: 转染 miR-105-5p 抑制物后, MKN-1 细胞中 DIRAS3 的表达水平明显上调

Figure 8 Verification of the target gene of miR-105-5p A: DIRAS3 expression significantly down-regulated in BGC-823 after transfection with miR-105-5p mimics; B: DIRAS3 expression significantly up-regulated in MKN-1 cells after transfection with miR-105-5p inhibitors

3 讨论

越来越多的研究表明,异常表达的 miRNA 与 GC 细胞的发生发展密切相关^[8]。例如,GC 中高表达的 miR-371a-3p 能够通过靶向作用于 TOB1 促进肿瘤细胞的侵袭、迁移、增殖和克隆形成能力^[16]; miR-495-3p 能够调控 GRP78/mTOR 信号通路介导的细胞自噬,从而影响 GC 的进展^[17]。值得注意的是,近年来研究发现 miR-105-5p 可能与结直肠癌^[12]、胶质瘤^[14]以及前列腺癌^[15]等多种恶性肿瘤的侵袭、转移、增殖、化疗药物敏感性以及患者预后等密切相关。这就提示 miR-105-5p 可能与肿瘤的发生发展密切相关,具有可观的潜在临床应用价值。但是目前 miR-105-5p 在 GC 中的表达及功能尚罕有报道。

本研究首先探讨了 miR-105-5p 在 GC 中的表达情况和临床意义。结果显示 miR-105-5p 在 GC 组织和细胞中表达量均显著上调,并且 5 种细胞系中 BGC-823 表达最低, MKN-1 表达最高。此外,高表达的 miR-105-5p 与肿瘤大小、远处转移及不良预后显著相关。上述结果表明, miR-105-5p 可能为 GC

的促癌基因,并且可能具有一定的临床应用价值。

为了探讨 miR-105-5p 对 GC 细胞恶性生物学行为的影响,本研究检测了 miR-105-5p 表达量的改变对 GC 细胞的迁移、侵袭及增殖能力的影响。结果显示,当 GC 细胞中 miR-105-5p 的表达水平改变之后,GC 细胞的侵袭、迁移及增殖能力也随之被正向调控。上述结果表明, miR-105-5p 为 GC 的促癌基因,其能够促进 GC 细胞的侵袭、迁移和增殖。

大量的研究表明, miRNA 能够通过下游靶基因的 3'-UTR 结合从而抑制靶基因的表达来发挥作用^[18]。本研究中,来自多种生物信息学软件的结果均显示, miR-105-5p 能够与 DIRAS3 基因的 3'-UTR 结合,即 DIRAS3 为 miR-105-5p 潜在的靶基因。DIRAS3 基因编码的蛋白是 ras 超家族的一员,与肿瘤的发生发展密切相关^[19]。DIRAS3 在乳腺癌、胰腺癌和卵巢癌等多种肿瘤中均可作为抑癌基因参与肿瘤的生物进程,其能够通过作用于 Ras/MAP、PI3K/Akt、APK/ERK1/2 等通路调控肿瘤细胞的侵袭、转移、增殖能力及自噬等^[20-22]。值得注意的是,近期研究^[23-25]发现 DIRAS3 作为抑癌基因不仅能够抑制 GC 细胞的侵袭、转移、增

殖和自噬,并且临床数据还表明其表达量与GC患者的预后也密切相关。例如, Qiu等^[23]通过体外和体内实验对DIRAS3在GC细胞中的抑癌机制的深入研究发现, DIRAS3不仅能调控AKT1-MTOR和RAS-MAPK信号通路,还能调控自噬相关的转录因子FOXO3/FOXO3A和TFEB的核定位。因此,从本研究结果推测, miR-105-5p可能通过靶向作用于DIRAS3发挥其促GC的作用。为了证实DIRAS3为miR-105-5p的靶点,本研究应用荧光素酶报告基因实验和Western blot实验对这一假设进行了验证。结果发现, miR-105-5p能够通过和DIRAS3的3'-UTR直接结合从而负向调控GC细胞中的DIRAS3表达水平。上述结果表明, GC细胞中, DIRAS3是miR-105-5p的靶基因。结合既往研究,笔者推测, GC细胞中miR-105-5p通过靶向作用于DIRAS3,进而影响DIRAS3对FAK/Rho、PI3K等信号通路以及转录因子FOXO3/FOXO3A和TFEB的核定位的调节,从而影响GC细胞的迁移、侵袭以及增殖等。

综上所述,本研究通过一系列实验首次阐明了miR-105-5p在GC中的表达情况、临床意义以及可能的作用机制。结果表明miR-105-5p在GC中高表达,并且与GC的肿瘤大小、远处转移以及不良预后密切相关;此外, miR-105-5p能够通过靶向作用于DIRAS3促进GC细胞的迁移、侵袭和增殖能力,为GC靶向治疗的相关研究提供了一定的实验基础和理论依据。

参考文献

- [1] Zurleni T, Gjoni E, Altomare M, et al. Conversion surgery for gastric cancer patients: A review[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2018, 10(11):398-409. doi: 10.4251/wjgo.v10.i11.398.
- [2] Einama T, Abe H, Shichi S, et al. Long-term survival and prognosis associated with conversion surgery in patients with metastatic gastric cancer[J]. *Mol Clin Oncol*, 2017, 6(2):163-166. doi: 10.3892/mco.2017.1128.
- [3] 吴永丰, 刘兴洲, 柳东, 等. 血管导向淋巴清扫术在腹腔镜胃癌根治术中的应用价值[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(12):1589-1596. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2018.12.015.
Wu YF, Liu XZ, Liu D, et al. Application value of vessel-guided lymph node dissection in laparoscopic radical gastrectomy for gastric cancer[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2018, 27(12):1589-1596. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2018.12.015.
- [4] 殷凯, 瞿建国, 陈吉祥, 等. 胃癌神经侵犯的相关临床病理因素: 单中心509例分析[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(4):396-400. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.04.002.
Yin K, Qu JG, Chen JX, et al. Clinicopathologic factors related to perineural invasion of gastric cancer: analysis of 509 cases in a single center[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2018, 27(4):396-400. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.04.002.
- [5] Beom SH, Choi YY, Baek SE, et al. Multidisciplinary treatment for patients with stage IV gastric cancer: the role of conversion surgery following chemotherapy[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):1116. doi: 10.1186/s12885-018-4998-x.
- [6] Lochman P, Koci J, Paral J. Quality of life after proximal gastrectomy a review[J]. *Rozhl Chir*, 2018, 97(8):368-372.
- [7] Haider MT, Taipaleenmaki H. Targeting the Metastatic Bone Microenvironment by MicroRNAs[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9:202. doi: 10.3389/fendo.2018.00202.
- [8] Yuan HL, Wang T, Zhang KH. MicroRNAs as potential biomarkers for diagnosis, therapy and prognosis of gastric cancer[J]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11:3891-3900. doi: 10.2147/OTT.S156921.
- [9] 房锋, 宋天强. 微小RNA在肝细胞癌中的相关研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(7):899-909. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.07.015.
Fang F, Song TQ. Research progress associated with microRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2018, 27(7):899-909. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.07.015.
- [10] Anfossi S, Fu X, Nagvekar R, et al. MicroRNAs, Regulatory Messengers Inside and Outside Cancer Cells[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1056:87-108. doi: 10.1007/978-3-319-74470-4_6.
- [11] 王宇锋, 刘志奎, 姚博文, 等. 肝癌细胞中miR-376c的表达及其与高迁移率蛋白A2的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(7):861-869. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.008.
Wang YF, Liu ZK, Yao BW, et al. Expression of miR-376c in hepatocellular carcinoma cells and its relation with high mobility group A2[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2017, 26(7):861-869. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.07.008.
- [12] Shen Z, Zhou R, Liu C, et al. MicroRNA-105 is involved in TNF-alpha-related tumor microenvironment enhanced colorectal cancer progression[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(12):3213. doi: 10.1038/s41419-017-0048-x.
- [13] Shen G, Rong X, Zhao J, et al. MicroRNA-105 suppresses cell proliferation and inhibits PI3K/AKT signaling in human hepatocellular carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(12):2748-2755. doi: 10.1093/carcin/bgu208.
- [14] Liu X, Wang H, Zhu Z, et al. MicroRNA-105 targets SOX9 and inhibits human glioma cell progression[J]. *FEBS Lett*, 2016, 590(23):4329-4342. doi: 10.1002/1873-3468.12458.
- [15] Honeywell DR, Cabrita MA, Zhao H, et al. miR-105 inhibits

- prostate tumour growth by suppressing CDK6 levels[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e70515. doi: 10.1371/journal.pone.0070515.
- [16] Guo H, Ji F, Zhao X, et al. MicroRNA-371a-3p promotes progression of gastric cancer by targeting TOB1[J]. *Cancer Lett*, 2019, 443:179–188. doi: 10.1016/j.canlet.2018.11.021.
- [17] Chen S, Wu J, Jiao K, et al. MicroRNA-495-3p inhibits multidrug resistance by modulating autophagy through GRP78/mTOR axis in gastric cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11):1070. doi: 10.1038/s41419-018-0950-x.
- [18] Yang N, Zhu S, Lv X, et al. MicroRNAs: Pleiotropic Regulators in the Tumor Microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:2491. doi: 10.3389/fimmu.2018.02491.
- [19] Yu Y, Fujii S, Yuan J, et al. Epigenetic regulation of ARHI in breast and ovarian cancer cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 983:268–277.
- [20] Ye K, Wang S, Yang Y, et al. Aplasia Ras homologue member overexpression inhibits tumor growth and induces apoptosis through inhibition of PI3K/Akt survival pathways in human osteosarcoma MG-63 cells in culture[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(3):776–782. doi: 10.3892/ijmm.2015.2278.
- [21] Hu Y, Yang H, Lu XQ, et al. ARHI suppresses pancreatic cancer by regulating MAPK/ERK 1/2 pathway[J]. *Pancreas*, 2015, 44(2):342–343. doi: 10.1097/MPA.0000000000000274.
- [22] Lu Z, Yang H, Sutton MN, et al. ARHI (DIRAS3) induces autophagy in ovarian cancer cells by downregulating the epidermal growth factor receptor, inhibiting PI3K and Ras/MAP signaling and activating the FOXo3a-mediated induction of Rab7[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(8):1275–1289. doi: 10.1038/cdd.2014.48.
- [23] Qiu J, Li X, He Y, et al. Distinct subgroup of the Ras family member 3 (DIRAS3) expression impairs metastasis and induces autophagy of gastric cancer cells in mice[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(10):1869–1886. doi: 10.1007/s00432-018-2708-3.
- [24] Tang HL, Hu YQ, Qin XP, et al. Aplasia ras homologue member I is downregulated in gastric cancer and silencing its expression promotes cell growth in vitro[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 27(8):1395–1404. doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07146.x.
- [25] Wang W, Bu XM, Wang J, et al. The expression of ARHI in pT2a and pT2b stage gastric cancer and its clinical significance[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(6):1953–1959. doi: 10.3892/or.2012.1727.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 张雷, 王宇锋, 王亮, 等. miR-105-5p在胃癌中的表达及其意义与生物学功能[J]. 中国普通外科杂志, 2019, 28(4):423–432. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.04.007

Cite this article as: Zhang L, Wang YF, Wang L, et al. Expression of miR-105-5p in gastric cancer and its significance and biological function[J]. *Chin J Gen Surg*, 2019, 28(4):423–432. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2019.04.007

本刊 2019 年各期重点内容安排

本刊 2019 年各期重点内容安排如下, 欢迎赐稿。

第 1 期 肝细胞癌基础与临床

第 2 期 胆道外科基础与临床

第 3 期 胰腺疾病基础与临床

第 4 期 胃肠肿瘤基础与临床

第 5 期 乳腺、甲状腺肿瘤基础与临床

第 6 期 主动脉疾病基础与临床

第 7 期 肝脏外科手术技术及方法

第 8 期 胆道外科手术技术及方法

第 9 期 胰腺外科手术技术及方法

第 10 期 胃肠外科手术技术及方法

第 11 期 乳腺、甲状腺外科手术技术及方法

第 12 期 血管外科手术技术及方法

中国普通外科杂志编辑部