



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2021.08.006  
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2021.08.006  
Chinese Journal of General Surgery, 2021, 30(8):917-925.

· 基础研究 ·

## miR-200a-3p在胆囊癌中的表达及其作用与机制

孔祥海, 胡敏, 王笛乐, 王李理, 何涛

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院 普通外科, 湖北 武汉 430014)

### 摘要

**背景与目的:** miR-200a-3p参与了多种肿瘤的生物学过程的调控,但在不同肿瘤中起着不同的作用(促癌基因或抑癌基因)。目前,其在胆囊癌中的作用尚不清楚。因此,本研究探讨miR-200a-3p在胆囊癌中的表达及其对胆囊癌细胞生物学功能的影响与机制。

**方法:** 采用qRT-PCR法测定32例胆囊癌及癌旁组织、胆囊癌细胞系(GBC-SD、SGC-996、NOZ)及正常人胆囊上皮细胞系HGBEC中miR-200a-3p的表达。采用Lipofectamine™ 3000试剂盒将GBC-SD及NOZ细胞系分别转染miR-200a-3p模拟物(miR-200a-3p过表达组)、miR-200a-3p抑制物序列(miR-200a-3p沉默组)及阴性对照序列(阴性对照组)。MTT实验测定细胞增殖能力,Transwell实验测定细胞侵袭能力, MiRBD/Targetscan7.2/starBase2.0/miRtarbase网站预测miR-200a-3p的下游靶基因,并采用荧光素酶实验验证。Western blot检测上述3组细胞中靶基因与上皮间质转化(EMT)相关分子蛋白(E-cadherin、vimentin)的表达。

**结果:** qRT-PCR结果显示,胆囊癌组织中miR-200a-3p表达量低于癌旁组织,所有胆囊癌细胞系中miR-200a-3p表达量低于正常人胆囊上皮系HGBEC(均 $P<0.05$ )。GBC-SD及NOZ细胞系转染后,与各自的阴性对照组比较,两种细胞的miR-200a-3p过表达组miR-200a-3p表达量明显升高、增殖与侵袭能力明显减弱,两种细胞的miR-200a-3p沉默组miR-200a-3p表达量明显降低、增殖与侵袭能力明显增强(均 $P<0.05$ )。在线网站预测显示,miR-200a-3p和Notch2存在潜在结合位点;荧光素酶实验显示,miR-200a-3p导致Notch2野生型质粒pmirGLO-Notch2-3'UT WT荧光素酶活性明显降低,而miR-200a-3p对Notch2突变型质粒pmirGLO-Notch2-3'UTR MUT的荧光素酶活性没有影响。Western blot结果显示,两种细胞的miR-200a-3p过表达组与各自的阴性对照组比较,E-cadherin蛋白表达量升高、vimentin蛋白与Notch2蛋白表达量降低,而3种蛋白在两种细胞的miR-200a-3p沉默组则呈相反的变化(均 $P<0.05$ )。

**结论:** miR-200a-3p在胆囊癌中表达降低,并可能起了抑癌基因的作用,其抑制胆囊癌细胞增殖和侵袭的机制可能与靶向下调Notch2从而抑制EMT过程有关。

### 关键词

胆囊肿瘤; 微RNAs; 细胞增殖; 肿瘤浸润; 上皮-间质转化

中图分类号: R735.8

## Expression of miR-200a-3p in gallbladder cancer and its effects and mechanism of action

KONG Xianghai, HU Min, WANG Dile, WANG Lili, HE Tao

(Department of General Surgery, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014, China)

收稿日期: 2021-06-06; 修订日期: 2021-07-16。

作者简介: 孔祥海, 华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院主治医师, 主要从事普通外科基础与临床方面的研究。

通信作者: 何涛, Email: 13507186847@163.com

**Abstract**

**Background and Aims:** MiR-200a-3p participates in the regulation of biological processes in a variety of tumors, but it exerts different effects in different tumors (oncogene or tumor suppressor). At present, its role in gallbladder cancer is still unclear. Therefore, this study was conducted to investigate the expression of miR-200a-3p in gallbladder cancer as well as its effects on biological behaviors of gallbladder cancer cells and the mechanism.

**Methods:** The expressions of miR-200a-3p in 32 specimens of gallbladder cancer tissue and adjacent tissue as well as in different gallbladder cancer cell lines (GBC-SD, SGC-996, and NOZ) and normal human gallbladder epithelial cell line HGBEC were determined by qRT-PCR method. The GBC-SD and NOZ cell lines were transfected with miR-200a-3p-mimics (miR-200a-3p overexpression group), miR-200a-3p-inhibitors (miR-200a-3p silencing group) and scramble sequences (negative control group) respectively using Lipofectamine™ 3000 kit. The proliferation and invasion abilities of the cells were examined by MTT assay and Transwell assay. The downstream target genes of miR-200a-3p were predicted using MiRBD/Targetscan7.2/starBase2.0/miRtarbase website, and were verified by Luciferase experiment. The protein expressions of the target genes and the molecules (E-cadherin and vimentin) associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in above three groups of cells were measured by Western blot analysis.

**Results:** The results of qRT-PCR showed that the expression level of miR-200a-3p in gallbladder cancer tissue was lower than that in adjacent tissue, and the expression levels of miR-200a-3p in all gallbladder cancer cell lines were lower than that in normal human gallbladder epithelial cell line HGBEC (all  $P < 0.05$ ). In GBC-SD and NOZ cell lines after transfection, the expressions of miR-200a-3p were significantly increased and the proliferative and invasion abilities were significantly decreased in miR-200a-3p overexpression groups of both cell lines, while the expressions of miR-200a-3p were significantly decreased and the proliferative and invasion abilities were significantly increased in miR-200a-3p silencing groups of both cell lines compared with their respective negative control groups (all  $P < 0.05$ ). Online website prediction showed that there were potential binding sites between miR-200a-3p and Notch2. Luciferase verification experiments showed that miR-200a-3p caused markedly decreased luciferase activity in Notch2 wild-type plasmid pmirGLO-Notch2-3'UT WT, but exerted no effect on the luciferase activity of Notch2 mutant plasmid pmirGLO-Notch2-3'UTR MUT. The results of Western blot analysis showed the E-cadherin protein expressions were increased and the protein expressions of vimentin and Notch2 were decreased in miR-200a-3p overexpression groups of both cell lines, while the opposite changes in the three proteins were observed in miR-200a-3p silencing groups of both cell lines compared with their respective negative control groups (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The expression of miR-200a-3p is decreased in gallbladder cancer, and it may play a tumor suppressor role in gallbladder cancer, and the mechanism may be probably associated with its down-regulating Notch2 and thereby inhibiting the EMT process.

**Key words**

Gallbladder Neoplasms; MicroRNAs; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness; Epithelial-Mesenchymal Transition

**CLC number:** R735.8

胆囊癌是一种来源于胆囊上皮的恶性肿瘤，约占全部胆道肿瘤的80%~95%<sup>[1-2]</sup>。全球肿瘤流行病学调查显示，2018年约有22万例新发患者和超过15万例患者死于胆囊癌<sup>[3]</sup>。与其他消化道肿瘤相比，胆囊癌起病隐匿，早期可通过直接浸润、淋巴结和血液扩散转移<sup>[4-5]</sup>。由于肿瘤筛查不足和缺乏特

异性肿瘤标志物，大多数患者在确诊时已进入中晚期，5年生存率低于5%<sup>[6]</sup>。深入研究胆囊癌的发病机制对提高诊治水平具有重要的意义。microRNA (miRNA) 是一种长度为17~25 nt的短链高度保守的非编码RNA，其主要通过与靶基因mRNA的3'-UTR端互补序列结合以降解或抑制靶基

因 mRNA 而沉默基因表达<sup>[7-8]</sup>。文献<sup>[9]</sup>报道 miRNA 可通过调节下游特定靶基因抑制肿瘤细胞侵袭和增殖。miR-200a-3p 是新鉴定的 miRNA 分子, 基因位于 22 号染色体上, 在非小细胞肺癌<sup>[10]</sup>、胃癌<sup>[11]</sup>、视网膜母细胞瘤<sup>[12]</sup>、肾细胞癌<sup>[13]</sup>中发挥抑癌基因的作用, 但是在卵巢癌<sup>[14]</sup>中却扮演癌基因的角色。尽管如此, miR-200a-3p 在胆囊癌中的表达情况, 及对增殖和侵袭的影响及机制鲜见报道。本研究旨在探讨胆囊癌患者癌组织和细胞系中 miR-200a-3p 表达情况及对细胞增殖和侵袭的影响, 并探讨可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床组织标本采集

本研究纳入我院普外科于 2016 年 1 月—2020 年 12 月收治并接受胆囊癌切除术的 32 例患者, 其中男 18 例, 女 14 例; 平均年龄 (58.9±5.0) 岁。采集胆囊癌患者术后癌及癌旁组织并保存于 -80 °C 冰箱待测。纳入标准: (1) 通过病理和影像学诊断为胆囊癌的患者; (2) 均接受胆囊癌切除术。排除标准: (1) 存在其他部位的肿瘤患者; (2) 临床检验资料不全者。本研究经我院伦理委员会批准并符合赫尔辛基宣言。

### 1.2 主要仪器和试剂

胆囊癌细胞系 GBC-SD、SGC-996、NOZ, 及正常人胆囊上皮细胞系 HGBEC 由华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆胰外科实验室赠予。Notch2、上皮间质转化 (EMT) 相关分子 (E-cadherin、vimentin)、GAPDH 一抗和 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗购自美国 Abcam 公司。RIPA 试剂盒、BCA 蛋白试剂盒、ECL 试剂盒、胰蛋白酶和 Lipofectamine™ 3000 转染试剂购自美国 Thermo Scientific 公司。TransScript II Green 两步法 qRT-PCR SuperMix (AQ301-01) 和 TransScript Green miRNA 两步法 qRT-PCR SuperMix (AQ202-01) 试剂盒购自广州锐博生物公司。MTT 细胞增殖检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司。Transwell 试剂盒购自美国 Gibco 公司。RT-PCR 仪购自美国 BD 公司。上海吉玛公司负责 miR-200a-3p 模拟物序列、miR-200a-3p 抑制物序列及阴性对照序列的设计和合成。

### 1.3 细胞培养及分组

胆囊癌细胞系 (GBC-SD、SGC-996、NOZ) 及

正常人胆囊上皮系 HGBEC 在含有 10%FBS、青霉素-链霉素 DMEM 培养基中培养, 在 37 °C 和 5%CO<sub>2</sub> 的加湿培养箱中培养。细胞转染采用 Lipofectamine™ 3000 试剂盒, 对 GBC-SD 及 NOZ 细胞系按试剂盒说明书转染 miR-200a-3p 模拟物 (miR-200a-3p 过表达组)、miR-200a-3p 抑制物 (miR-200a-3p 沉默组)、阴性对照序列 (阴性对照组), 转染成功后行后续实验。

### 1.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验

使用 TRIzol 试剂盒提取细胞系、癌和癌旁组织中的总 RNA, 通过紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 然后按照试剂盒指导进行逆转录。反应条件: 95 °C 15 min; 95 °C 15 s; 58 °C 30 s; 72 °C 15 min, 共 35 个循环。每个标本设 3 个复孔, 每个标本测定 3 次, 以 U6 作为 miR-200a-3p 内参。使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 miR-200a-3p 的相对表达量。miR-200a-3p 引物序列正向引物: 5'-TAA CAC TGT CTG GTA ACG ATGT-3', 逆向引物: 5'-CAT CTT ACC GGA CAG TGC TGG A-3'。U6 引物序列正向引物: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 逆向引物: 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。

### 1.5 细胞增殖测定

采用 MTT 实验测定细胞增殖能力, 将转染 24 h 的 3 组细胞以 4×10<sup>6</sup> 个细胞/孔置于 96 孔板中, 置入后 0、24、48、72 h 每孔加入 10 μL MTT 溶液和 90 μL DMEM 培养液, 然后 37 °C 下培养 2 h 后, 通过酶标仪测量每孔在 490 nm 处的光密度值 A<sub>490 nm</sub>。

### 1.6 细胞侵袭测定

将转染 24 h 的 3 组细胞以 5×10<sup>4</sup> 个细胞/孔置于 6 孔板上。将细胞和 DMEM 培养液 (200 μL) 置于上隔室, 将 500 μL 含 20% FBS 的 DMEM 培养液置于下隔室。37 °C 培养 48 h 后, 擦去未能穿膜的基质和细胞。漂洗 3 次, 多聚甲醛固定 10 min。穿膜的侵袭细胞用 0.5% 结晶紫染色, 并在 200× 视野下用显微镜进行计数分析。

### 1.7 Western blot 检测

收集各组培养细胞, RIPA 裂解提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。总蛋白通过 12%SDS-PAGE 分离, 转膜至 PVDF 膜上。加入 Notch2 (1:300)、E-cadherin (1:200)、vimentin (1:300) 及 GAPDH (1:500) 一抗并在 4 °C 下孵育过夜, 漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (1:500) 在室温下孵育 1 h。ECL 化学发光试剂盒用于检测目

标蛋白条带，扫描条带灰度，通过 Quantity One 计算其灰度值。目的蛋白相对表达量=目的蛋白条带灰度值/GAPDH 条带灰度值。

### 1.8 miR-200a-3p 靶基因预测和验证

MiRBD/Targetscan7.2/starBase2.0/miRtarbase 网站用于预测 miR-200a-3p 的下游靶基因。采用荧光素酶实验验证 miR-200a-3p 的靶基因，使用 Lipofectamine™ 3000 试剂盒将 miR-200a-3p 模拟物分别与 PmirGLO-Notch2-3'UTR 野生型质粒 (WT)、pmirGLO-Notch2-3'UTR 突变型质粒 (MUT) 共转移到 HEK293T 细胞中。荧光素酶活性用萤火虫荧光素酶活性检测试剂盒进行检测。

### 1.9 统计学处理

本研究采用 SPSS 20.0 进行数据分析，GraphPad 7 进行绘图。多组比较通过方差分析进

行，在方差分析有意义的基础上采用 LSD-*t* 检验行两组间比较，多个时间点的数据通过重复测量方差比较， $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-200a-3p 在胆囊癌组织及细胞系中的表达

胆囊癌组织中 miR-200a-3p 表达量低于癌旁组织 [ $(1.63 \pm 0.65)$  vs.  $(4.38 \pm 1.13)$ ,  $P < 0.05$ ] (图 1A); 胆囊癌细胞系 GBC-SD、SGC-996、NOZ 中 miR-200a-3p 表达量分别为  $1.18 \pm 0.06$ 、 $1.06 \pm 0.05$ 、 $0.87 \pm 0.04$ ，正常人胆囊上皮系 HGBEC 中 miR-200a-3p 表达量为  $3.54 \pm 0.12$ ，胆囊癌细胞系 GBC-SD、SGC-996、NOZ 中 miR-200a-3p 表达量低于正常人胆囊上皮系 HGBEC (均  $P < 0.05$ ) (图 1B)。

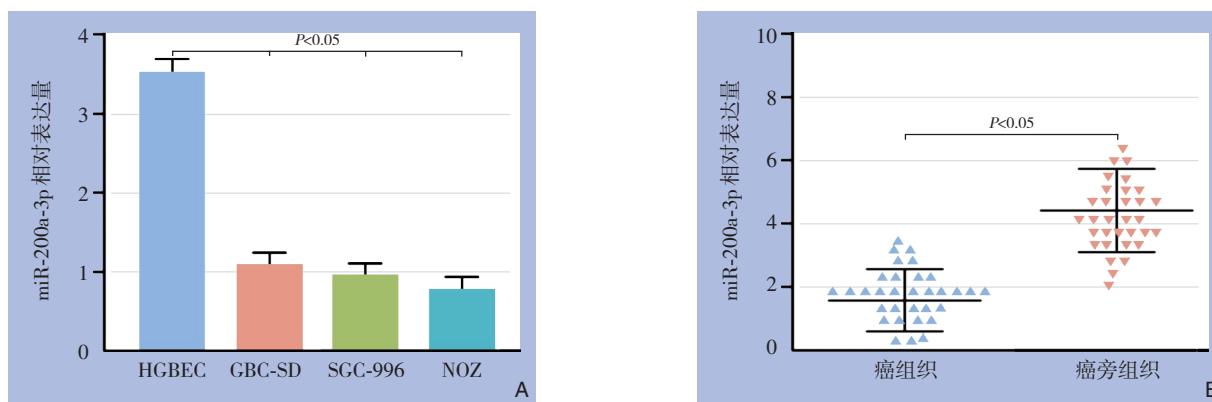


图1 qRT-PCR检测 miR-200a-3p 的表达 A: miR-200a-3p 在胆囊癌组织与癌旁组织中的表达; B: miR-200a-3p 在胆囊癌细胞系与胆囊上皮细胞系中的表达

Figure 1 Expression of miR-200a-3p determined by qRT-PCR A: Expressions of miR-200a-3p in gallbladder cancer and adjacent tissues; B: Expressions of miR-200a-3p in gallbladder cancer cell lines and normal human gallbladder epithelial cell line

### 2.2 转染效率检测

GBC-SD 及 NOZ 细胞系经转染 miR-200a-3p 模拟物及抑制物序列后，行 qRT-PCR 检测，结果显示，两种细胞的 miR-200a-3p 过表达组 miR-200a-3p 表达量均高于各自的阴性对照组 (均  $P < 0.05$ )，两种细胞的 miR-200a-3p 沉默组 miR-200a-3p 表达量均低于各自的阴性对照组 (均  $P < 0.05$ )，提示转染成功，可行下步实验 (图 2)。

### 2.3 miR-200a-3p 对胆囊癌细胞增殖的影响

MTT 实验显示，转染 24 h 后，两种细胞各组的  $A_{490 \text{ nm}}$  值差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )，转染

48、72 及 96 h 后，两种细胞的 miR-200a-3p 过表达组  $A_{490 \text{ nm}}$  值均明显低于各自的阴性对照组 (均  $P < 0.05$ )，两种细胞的 miR-200a-3p 沉默组  $A_{490 \text{ nm}}$  值均明显高于各自的阴性对照组 (均  $P < 0.05$ ) (图 3)。

### 2.4 miR-200a-3p 对胆囊癌细胞侵袭能力的影响

GBC-SD 及 NOZ 细胞系经转染 miR-200a-3p 模拟物及抑制物序列后，Transwell 实验显示，两种细胞的 miR-200a-3p 过表达组侵袭细胞数均少于各自的阴性对照组 (均  $P < 0.05$ )，两种细胞的 miR-200a-3p 沉默组侵袭细胞数均多于各自的阴性对照组 (均  $P < 0.05$ ) (图 4)。

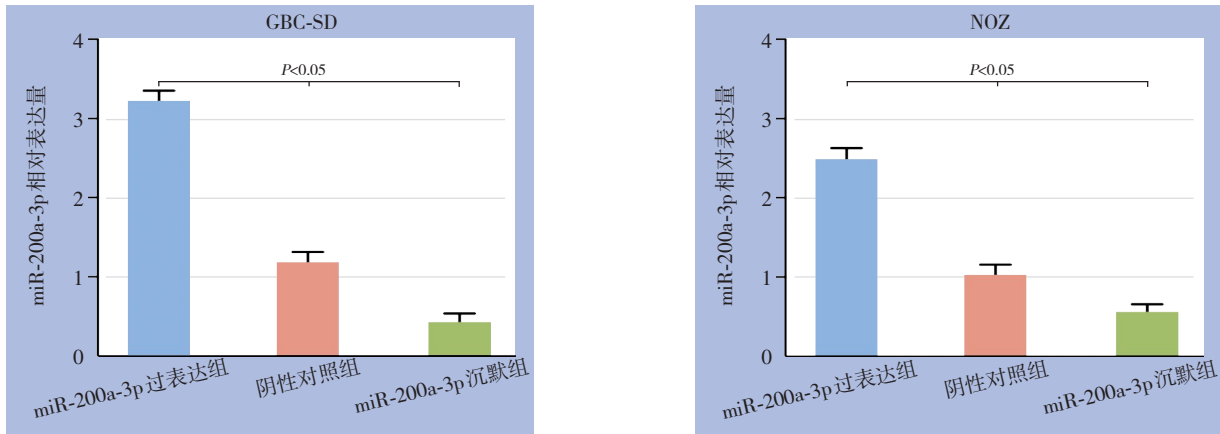


图2 qRT-PCR检测转染效率

Figure 2 Determination of transfection efficiency by qRT-PCR

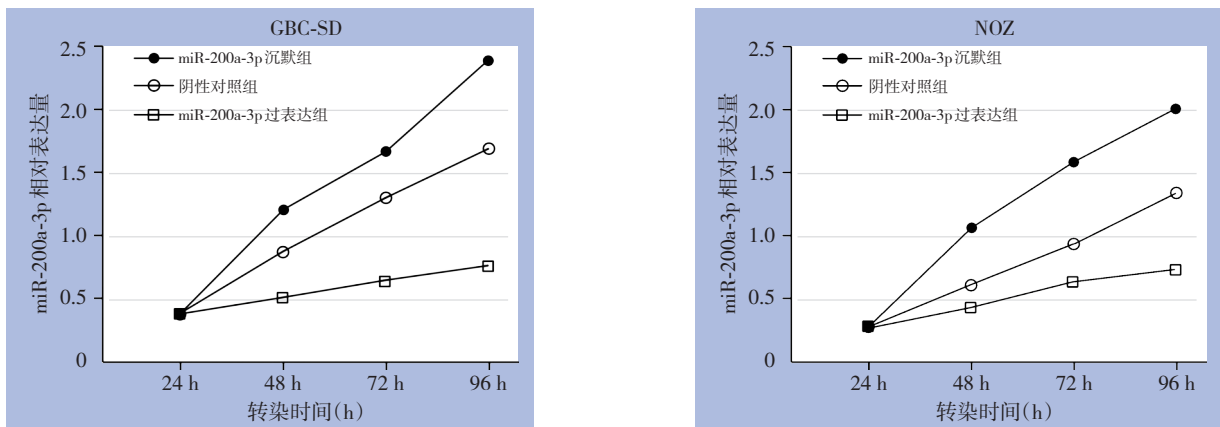


图3 miR-200a-3p对胆囊癌细胞增殖的影响

Figure 3 Influence of miR-200a-3p on proliferation of gallbladder cancer cells

### 2.5 miR-200a-3p靶基因预测

在线预测网站 (TargetsScan 7.2/starBase 2.0/miRBD/miRtarbase) 检索分析显示 miR-200a-3p 和 Notch2 存在潜在结合位点 (图 5A)。荧光素酶实验发现, miR-200a-3p 导致 Notch2 野生型质粒 pmirGLO-Notch2-3'UT WT 荧光素酶活性明显降低, 而 miR-200a-3p 对 Notch2 突变型质粒 pmirGLO-Notch2-3'UTR MUT 的荧光素酶活性没有影响 (图 5B)。

### 2.6 miR-200a-3p 表达与 Notch2 及 EMT 相关分子蛋白表达的关系

GBC-SD 及 NOZ 细胞系经转染 miR-200a-3p 模拟物及 miR-200a-3p 抑制物序列后, 两种细胞的 miR-200a-3p 过表达组 E-cadherin 蛋白表达量高于各自的阴性对照组、vimentin 蛋白表达量低于各自的阴性对照组、Notch2 蛋白表达量低各自的于阴性对照组 (均  $P < 0.05$ )。两种细胞的 miR-200a-3p 沉默组 E-cadherin 蛋白表达量低于各自的阴性对照组、vimentin 蛋白表达量高于各自的阴性对照组、Notch2 蛋白表达量高于各自的阴性对照组 (均  $P < 0.05$ ) (图 6)。

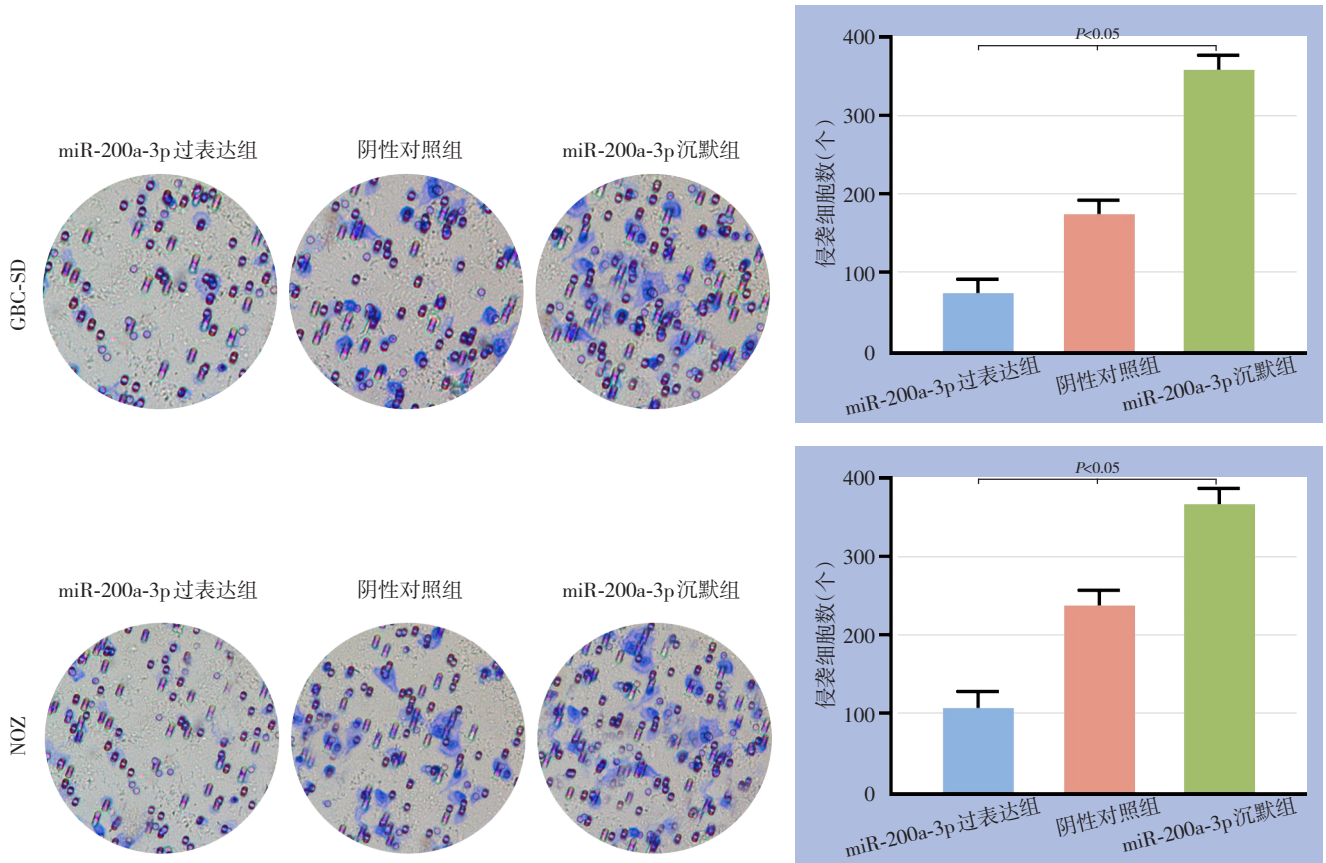


图4 miR-200a-3p对胆囊癌细胞侵袭能力的影响  
Figure 4 Influence of miR-200a-3p on invasion abilities of gallbladder cancer cells

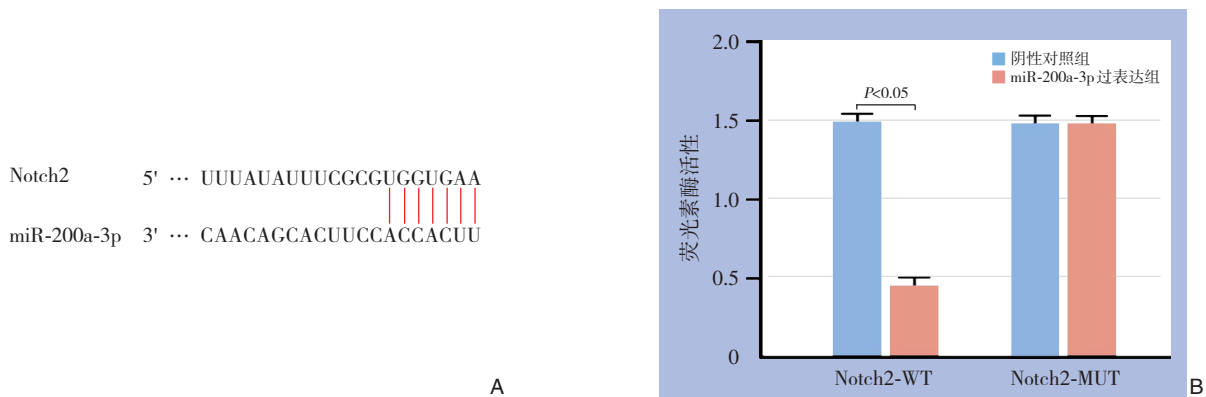


图5 miR-200a-3p的靶基因预测 A: 在线网站预测 miR-200a-3p与Notch2存在靶向结合位点; B: 荧光素酶实验验证Notch2为miR-200a-3p的靶基因

Figure 5 Prediction of target genes of miR-200a-3p A: Binding sites between miR-200a-3p Notch2 predicted by online website analysis; B: Luciferase assay verification showing Notch2 is the target gene of miR-200a-3p

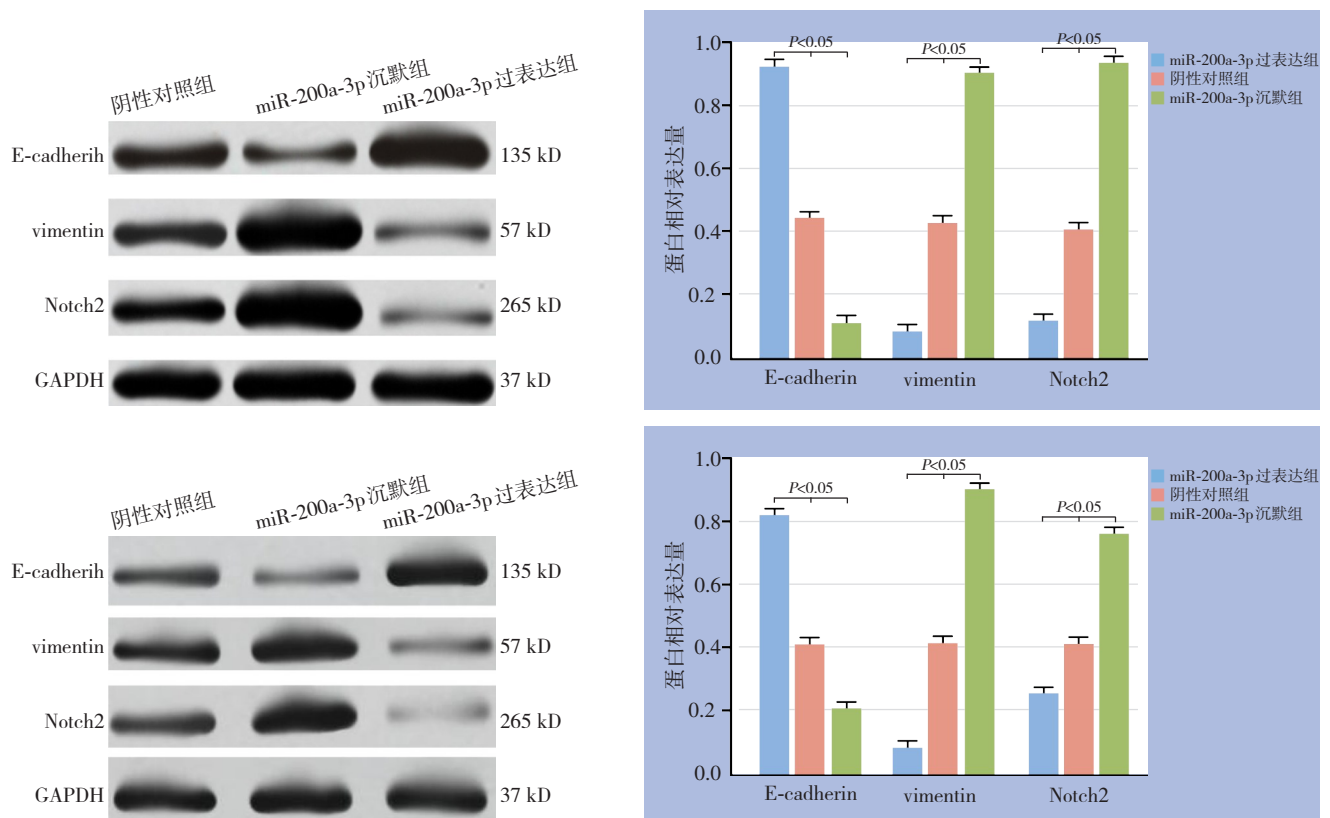


图 6 miR-200a-3p 的表达对 Notch2 及 EMT 相关分子蛋白表达的影响

Figure 6 Effects of miR-200a-3p on the expressions of Notch2 protein and EMT-associated molecules

### 3 讨论

胆囊癌患者病死率高的原因主要在于其起病隐匿,无明显早期临床特征,易于忽视;已诊断的胆囊癌常处于晚期,不适合手术,放化疗效果差;胆囊癌患者缺乏有效的筛查手段<sup>[15-16]</sup>。临床上缺乏针对胆囊癌特异性的肿瘤标志物,因此寻找对胆囊癌具有特异性的肿瘤标志物显得尤为重要。

miRNA 是不具有编码蛋白质功能的短链 RNA,其主要功能是与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 末端结合而调控下游靶基因的转录,起到抑制或降解靶基因的作用<sup>[17]</sup>。miR-200 家族共有 5 组成员,包括 miR-200a 家族、miR-200b 家族、miR-200c 家族、miR-429 家族及 miR-141 家族<sup>[18-19]</sup>。miR-200a-3p 属于 miR-200 家族,基因定位于染色体 22q21.12 上,在炎症反应<sup>[20]</sup>、心肌缺血再灌注损伤<sup>[21]</sup>和肿瘤中发挥重要的调控作用。在脑损伤诱导的脓毒症中,miR-200a-3p 可通过诱导活性氧促进炎症反应<sup>[20]</sup>。依据 miR-200a-3p 结合的靶标分子功能不同,miR-200a-3p 在不同的肿瘤中发挥抑癌或促癌作用。在非小细胞肺癌<sup>[10]</sup>中,miR-200a-3p 呈低表达,且 miR-200a-3p

低表达与预后差相关,上调 miR-200a-3p 可抑制胰岛素受体底物 2 (insulin receptor substrate 2, IRS2) 表达,进而抑制细胞增殖、迁移及侵袭过程。在胃癌<sup>[11]</sup>中,miR-200a-3p 起抑癌基因的作用,miR-200a-3p 可靶向调节 Krüppel 样因子 12 (KLF12) 表达,且上调 miR-200a-3p 可抑制胃癌细胞增殖和侵袭,并诱导细胞周期停滞。视网膜母细胞瘤<sup>[12]</sup>中,miR-200a-3p 可通过介导 PI3K-Akt/MAPK-ERK 信号通路抑制细胞增殖、侵袭及 EMT 过程。在肾细胞癌<sup>[13]</sup>中,miR-200a-3p 在癌组织中呈低表达,过表达 miR-200a-3p 通过靶向结合 E3 泛素蛋白连接酶,抑制肾细胞癌细胞增殖及迁移过程,并诱导细胞凋亡。然而,miR-200a-3p 在卵巢癌<sup>[14]</sup>却是促癌基因,miR-200a-3p 高表达与肿瘤大小、转移及 TNM 分期相关,并可促进细胞增殖、克隆形成及侵袭过程。本研究发现 miR-200a-3p 在胆囊癌组织中表达水平较正常癌旁组织显著降低,提示 miR-200a-3p 可能发挥抑癌基因功能。为探究 miR-200a-3p 参与胆囊癌发病的分子机制,在体外细胞实验中过表达及沉默胆囊癌细胞系 (GBC-SD、NOZ) 中 miR-200a-3p 表达水平,进行细胞增殖及侵袭实验,

发现上调 miR-200a-3p 表达后, GBC-SD 及 NOZ 细胞系细胞增殖能力受抑制, 侵袭细胞数减少; 反之, 下调 miR-200a-3p 表达后, 可促进 GBC-SD 细胞系细胞增殖能力, 侵袭细胞数增加。表明 miR-200a-3p 在胆囊癌中可能扮演抑癌基因的角色。这与非小细胞肺癌<sup>[10]</sup>、胃癌<sup>[11]</sup>、视网膜母细胞瘤<sup>[12]</sup>、肾细胞癌<sup>[13]</sup>中的结果一致, 但与卵巢癌<sup>[14]</sup>中的结果相反。可能与肿瘤的异质性及与 miR-200a-3p 结合的靶基因所扮演的不同功能有关。

EMT 是指上皮细胞失去原有极性, 从而获得抗凋亡和较强的迁移及侵袭能力, 进而转化为间质细胞的过程, 在上皮源性肿瘤中发挥重要作用<sup>[22-23]</sup>。本研究发现上调 miR-200a-3p 后, 代表上皮的标志物 E-cadherin 蛋白表达水平上调, 而代表间质的标志物 vimentin 却下调表达, 抑制 miR-200a-3p 表达后, E-cadherin 蛋白下调表达, 而 vimentin 上调表达, 提示 miR-200a-3p 过表达可抑制 EMT 过程, 这可能是 miR-200a-3p 发挥抑癌作用的机制之一。

Notch2 是一种编码跨膜蛋白的基因, 作为膜结合配体的受体并与相邻细胞发生相互作用<sup>[24]</sup>。Notch2 的改变通常与癌症特别是膀胱尿路上皮癌密切相关<sup>[25]</sup>。Notch 信号通路广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物中, 可调节细胞增殖、凋亡、分化及组织器官发育过程<sup>[26]</sup>。Notch 可通过 PI3K/Akt 及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路发挥促进细胞增殖和分化、抗凋亡的作用<sup>[27]</sup>。Notch 通路在 EMT 中起关键作用, Notch2 是 Notch 信号通路中的重要因子之一, 在卵巢上皮癌中, Notch2 分子被外泌体 miR-34b 分子调控, 并参与卵巢癌的 EMT 过程<sup>[28]</sup>。研究发现 miR-146a-5p 通过靶向 Notch2 介导食管鳞状细胞癌的 EMT 过程<sup>[29]</sup>。本研究通过在线网站预测和荧光素酶实验发现 miR-200a-3p 靶基因是 Notch2。对胆囊癌细胞系 GBC-SD 及 NOZ 转染 miR-200a-3p 模拟物序列上调 miR-200a-3p 表达后, Notch2 蛋白表达受抑制。反之, 转染 miR-200a-3p 抑制物序列下调 miR-200a-3p 表达后, Notch2 蛋白表达量上调, 这进一步验证了 Notch2 为 miR-200a-3p 的靶标分子。在本研究发现上调 miR-200a-3p 表达后, Western blot 结果显示 EMT 相关蛋白表达量发生变化, 且 Notch2 为 miR-200a-3p 作用的靶基因, 提示上调 miR-200a-3p 表达可能通过下调 Notch2 分子抑制 EMT 过程, 进而发挥抑癌功能。

由于本研究是在体外细胞系中的初步研究,

尚存在一定不足之处, 比如: 上调 miR-200a-3p 同时上调 Notch2 对癌细胞表型及下游分子改变的影响, miR-200a-3p 表达与胆囊癌患者术后预后的关系等, 都值得进一步研究。

综上, miR-200a-3p 可抑制胆囊癌细胞增殖和侵袭过程, 发挥抑癌基因功能, 机制可能与下调 Notch2 及抑制 EMT 过程有关。

#### 参考文献

- [1] Shukla SK, Singh G, Shahi KS, et al. Staging, treatment, and future approaches of gallbladder carcinoma[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2018, 49(1):9-15. doi: 10.1007/s12029-017-0036-5.
- [2] Pang L, Zhang Y, Wang Y, et al. Pathogenesis of gallbladder adenomyomatosis and its relationship with early-stage gallbladder carcinoma: an overview[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(6): e7411. doi: 10.1590/1414-431x20187411.
- [3] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
- [4] Kim BH, Kwon J, Chie EK, et al. Adjuvant chemoradiotherapy is associated with improved survival for patients with resected gallbladder carcinoma: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ann Surg Oncol*, 2018, 25(1):255-264. doi: 10.1245/s10434-017-6139-1.
- [5] Wang N, Xiang X, Chen K, et al. Targeting of NT5E by miR-30b and miR-340 attenuates proliferation, invasion and migration of gallbladder carcinoma[J]. *Biochimie*, 2018, 146: 56-67. doi: 10.1016/j.biochi.2017.10.027.
- [6] Neyaz A, Husain N, Gupta S, et al. Investigation of targetable predictive and prognostic markers in gallbladder carcinoma[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2018, 9(1): 111-120. doi: 10.21037/jgo.2017.10.02.
- [7] Agarwal V, Subtelny AO, Thiru P, et al. Predicting microRNA targeting efficacy in *Drosophila*[J]. *Genome Biol*, 2018, 19(1):152. doi: 10.1186/s13059-018-1504-3.
- [8] Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(1): 21-37. doi: 10.1038/s41580-018-0045-7.
- [9] Achkar NP, Cambiagno DA, Manavella PA. miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway[J]. *Trends Plant Sci*, 2016, 21(12):1034-1044. doi: 10.1016/j.tplants.2016.09.003.
- [10] Tan T, Xu XH, Lu XH, et al. miR-200a-3p suppresses the proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer



- through targeting IRS2[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(2):712–720. doi: 10.26355/eurrev\_202001\_20050.
- [11] Jia C, Zhang Y, Xie Y, et al. miR-200a-3p plays tumor suppressor roles in gastric cancer cells by targeting KLF12[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 3697–3703. doi: 10.1080/21691401.2019.1594857.
- [12] Zhao H, Wan J, Zhu Y. Carboplatin Inhibits the Progression of Retinoblastoma Through IncRNA XIST/miR-200a-3p/NRP1 Axis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3417–3427. doi: 10.2147/DDDT.S256813.
- [13] Ding M, Sun X, Zhong J, et al. Decreased miR-200a-3p is a key regulator of renal carcinoma growth and migration by directly targeting CBL[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(12):9974–9985. doi: 10.1002/jcb.27326.
- [14] Shi C, Yang Y, Zhang L, et al. MiR-200a-3p promoted the malignant behaviors of ovarian cancer cells through regulating PCDH9[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12:8329–8338. doi: 10.2147/OTT.S220339.
- [15] Pandey A, Stawiski EW, Durinck S, et al. Integrated genomic analysis reveals mutated ELFB3 as a potential gallbladder cancer vaccine candidate[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):4225. doi: 10.1038/s41467-020-17880-4.
- [16] Sahara K, Tsilimigras DI, Kikuchi Y, et al. Defining and predicting early recurrence after resection for gallbladder cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2021, 28(1):417–425. doi: 10.1245/s10434-020-09108-y.
- [17] Tiwari PK. Epigenetic biomarkers in gallbladder cancer[J]. *Trends Cancer*, 2020, 6(7):540–543. doi: 10.1016/j.trecan.2020.03.003.
- [18] Pan Y, Liang H, Chen W, et al. MicroRNA-200b and microRNA-200c promote colorectal cancer cell proliferation via targeting the reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs[J]. *RNA Biol*, 2015, 12(3):276–289. doi: 10.1080/15476286.2015.1017208.
- [19] Hu X, Macdonald DM, Huettner PC, et al. A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 114(3): 457–464. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.05.022.
- [20] Yu J, Chen J, Yang H, et al. Overexpression of miR200a3p promoted inflammation in sepsisinduced brain injury through ROSinduced NLRP3[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(5): 1811–1823. doi: 10.3892/ijmm.2019.4326.
- [21] Chang H, Li ZB, Wu JY, et al. Circ-100338 induces angiogenesis after myocardial ischemia-reperfusion injury by sponging miR-200a-3p[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(11):6323–6332. doi: 10.26355/eurrev\_202006\_21530.
- [22] Li X, Teng S, Zhang Y, et al. TROP2 promotes proliferation, migration and metastasis of gallbladder cancer cells by regulating PI3K/AKT pathway and inducing EMT[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29): 47052. doi: 10.18632/oncotarget.16789.
- [23] Nakada S, Kuboki S, Nojima H, et al. Roles of Pin1 as a key molecule for EMT induction by activation of STAT3 and NF- $\kappa$ B in human gallbladder cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2019, 26(3): 907–917. doi: 10.1245/s10434-018-07132-7.
- [24] Song X, Hu Y, Li Y, et al. Overview of current targeted therapy in gallbladder cancer[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1):230. doi: 10.1038/s41392-020-00324-2.
- [25] Kwon W, Kim H, Han Y, et al. Role of tumour location and surgical extent on prognosis in T2 gallbladder cancer: an international multicentre study[J]. *Br J Surg*, 2020, 107(10): 1334–1343. doi: 10.1002/bjs.11618.
- [26] Yang X, Duan B, Zhou X. Long non-coding RNA FOXD2-AS1 functions as a tumor promoter in colorectal cancer by regulating EMT and Notch signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(16):3586–3591.
- [27] Meurette O, Stylianou S, Rock R, et al. Notch activation induces Akt signaling via an autocrine loop to prevent apoptosis in breast epithelial cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(12): 5015–5022. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3478.
- [28] Lu S, Liu W, Shi H, et al. Exosomal miR34b inhibits proliferation and the epithelialmesenchymal transition by targeting Notch2 in ovarian cancer[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(3): 2721–2728. doi: 10.3892/ol.2020.11837.
- [29] Wang C, Zhang W, Zhang L, et al. miR-146a-5p mediates epithelial-mesenchymal transition of oesophageal squamous cell carcinoma via targeting Notch2[J]. *Br J Cancer*, 2016, 115(12): 1548–1554. doi: 10.1038/bjc.2016.367.

( 本文编辑 宋涛)

本文引用格式:孔祥海,胡敏,王笛乐,等. miR-200a-3p在胆囊癌中的表达及其作用与机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2021, 30(8):917–925. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2021.08.006

Cite this article as: Kong XH, Hu M, Wang DL, et al. Expression of miR-200a-3p in gallbladder cancer and its effects and mechanism of action[J]. *Chin J Gen Surg*, 2021, 30(8): 917–925. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2021.08.006