



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.08.008  
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2024.08.008  
China Journal of General Surgery, 2024, 33(8):1264-1273.

· 基础研究 ·

## microRNA-9 的表达及其负性调控 BAG4 对胃癌细胞增殖与侵袭的影响

王军<sup>1</sup>, 陈燕<sup>2</sup>, 闵光涛<sup>1</sup>, 朱俊亚<sup>3</sup>, 吕坤<sup>3</sup>, 乐奇<sup>3</sup>, 姜雷<sup>1</sup>

(兰州大学第一医院 1. 普通外科 2. 口腔科, 甘肃 兰州 730000; 3. 兰州大学第一临床医学院, 甘肃 兰州 730000)

### 摘要

**背景与目的:** 研究显示, microRNA-9 (miR-9) 在多种恶性肿瘤中表达下调, 但其在胃癌中的表达情况及功能尚有待明确。笔者前期通过生物信息学方法预测 Bcl-2 相关永生基因 4 (BAG4) 可能是 miR-9 的靶基因, 并且发现 BAG4 在胃癌组织中呈高表达。因此, 本研究探讨 miR-9 在胃癌中的表达与功能, 及其与 BAG4 的关系。

**方法:** 采用 qRT-PCR 法检测胃癌组织与癌旁组织, 以及胃癌细胞系与正常胃黏膜细胞中 miR-9 的表达水平。分别用 miR-9 模拟物和 miR-9 抑制物过表达和敲低胃癌细胞的 miR-9 后, 采用 CCK-8 法和克隆形成实验检测细胞增殖活性, Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力。荧光素酶报告基因实验分析 miR-9 和 BAG4 的靶向关系, 并用 qRT-PCR 法和 Western blot 检测转染 miR-9 模拟物和 si-BAG4 的胃癌细胞中 BAG4 的表达, 以及相关功能实验加以验证。

**结果:** miR-9 在胃癌组织 (vs. 癌旁组织) 和胃癌细胞系 (vs. 正常胃黏膜细胞) 中的表达均明显降低 (均  $P < 0.05$ )。miR-9 的表达与胃癌患者的肿瘤大小、肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移和 TNM 分期明显有关 (均  $P < 0.05$ )。miR-9 高表达胃癌患者的总生存率明显高于 miR-9 低表达胃癌患者 ( $P = 0.028$ )。胃癌细胞过表达 miR-9 后, 增殖和侵袭能力明显减弱, 而敲低 miR-9 后, 增殖和侵袭能力明显增强 (均  $P < 0.05$ )。荧光素酶报告基因实验显示 BAG4 是 miR-9 下游的靶基因。转染 miR-9 模拟物或 si-BAG4 的胃癌细胞中 BAG4 的 mRNA 与蛋白表达均明显降低, 而转染 miR-9 抑制物胃癌细胞中 BAG4 的 mRNA 与蛋白表达均明显降低 (均  $P < 0.05$ )。转染 si-BAG4 的胃癌细胞的增殖与侵袭能力明显降低, 同时转染 miR-9 抑制物可逆转 si-BAG4 对胃癌细胞增殖和侵袭能力的影响 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** miR-9 在胃癌中表达降低, 且其表达与胃癌的不良生物学特征密切相关, 其作用机制可能通过负性调控 BAG4 的表达, 从而影响胃癌细胞的增殖和侵袭。

### 关键词

胃肿瘤; 微 RNAs; Bcl-2 相关永生基因 4; 细胞增殖; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.2

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (82060527); 兰州大学第一医院院内基金资助项目 (ldyyyn2019-02); 甘肃省兰州市科技发展指导性计划基金资助项目 (2020-ZD-66)。

**收稿日期:** 2022-04-01; **修订日期:** 2022-08-27。

**作者简介:** 王军, 兰州大学第一医院副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤临床与基础方面的研究。

**通信作者:** 姜雷, Email: jiangzx@lzu.edu.cn

## The expression of microRNA-9 and its negative regulation of BAG4 on the proliferation and invasion of gastric cancer cells

WANG Jun<sup>1</sup>, CHEN Yan<sup>2</sup>, MIN Guangtao<sup>1</sup>, ZHU Junya<sup>3</sup>, LU Kun<sup>3</sup>, LE Qi<sup>3</sup>, JIANG Lei<sup>1</sup>

(1. Department of General Surgery 2. Department of Stomatology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 3. the First School of Clinical Medicine of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

### Abstract

**Background and Aims:** Research has shown that microRNA-9 (miR-9) is downregulated in various malignant tumors, but its expression and function in gastric cancer remain unclear. In a previous study, we predicted using bioinformatics methods that Bcl-2-associated athanogene 4 (BAG4) might be a target gene of miR-9, and we also found that BAG4 is highly expressed in gastric cancer tissues. Therefore, this study investigated the expression and function of miR-9 in gastric cancer and its relationship with BAG4.

**Methods:** The expression levels of miR-9 in gastric cancer tissues and adjacent non-cancerous tissues, as well as in gastric cancer cell lines and normal gastric mucosal cells, were detected using qRT-PCR. After overexpressing and knocking down miR-9 in gastric cancer cells using miR-9 mimics and inhibitors, cell proliferation was assessed using the CCK-8 assay and colony formation assay, and cell invasion was evaluated using a Transwell invasion assay. The targeting relationship between miR-9 and BAG4 was analyzed using a luciferase reporter assay. Then, the expression of BAG4 in gastric cancer cells transfected with miR-9 mimics or si-BAG4 was detected by qRT-PCR and Western blot, and related functional experiments were performed for validation.

**Results:** The expression of miR-9 was significantly lower in gastric cancer tissues (*vs.* adjacent non-cancerous tissues) and gastric cancer cell lines (*vs.* normal gastric mucosal cells) (all  $P < 0.05$ ). The expression of miR-9 was significantly associated with tumor size, depth of tumor invasion, lymph node metastasis, distant metastasis, and TNM stage in gastric cancer patients (all  $P < 0.05$ ). Patients with high miR-9 expression had a significantly higher overall survival rate than those with low miR-9 expression ( $P = 0.028$ ). Overexpression of miR-9 in gastric cancer cells significantly reduced proliferation and invasion abilities, while miR-9 knockdown significantly enhanced these abilities (both  $P < 0.05$ ). The luciferase reporter assay indicated that BAG4 was a downstream target gene of miR-9. In gastric cancer cells, both mRNA and protein expression levels of BAG4 were significantly reduced after transfection with miR-9 mimics or si-BAG4, while both mRNA and protein expression levels of BAG4 were significantly increased after transfection with miR-9 inhibitors (all  $P < 0.05$ ). Proliferation and invasion abilities of gastric cancer cells transfected with si-BAG4 were significantly reduced, and the co-transfection of miR-9 inhibitors reversed the effects of si-BAG4 on cell proliferation and invasion (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** miR-9 is downregulated in gastric cancer, and its expression is closely related to adverse biological characteristics of gastric cancer. The mechanism of action of miR-9 may involve negatively regulating BAG4 expression, thereby affecting the proliferation and invasion of gastric cancer cells.

### Key words

Stomach Neoplasms; MicroRNAs; Bcl-2-Associated Athanogene 4; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness

**CLC number:** R735.2

胃癌是常见的恶性肿瘤之一，全球每年约有100万新发病例，每年约有78.3万例死于胃癌，已成为严重危害人类健康的一类疾病<sup>[1]</sup>。近年来，胃癌的早期诊断和治疗方法都有了明显提高，但是胃癌患者的5年生存率并无显著提高。因此，迫切需要对胃癌的发生发展机制进行深入研究。现有证据<sup>[2-3]</sup>已显示 microRNA (miRNA) 参与了细胞的增殖、分化、增殖、凋亡、血管生成、迁移等多个生物学过程。异常表达的 miRNA 在多种恶性肿瘤的发生发展中均扮演着相当于抑癌基因或癌基因的角色<sup>[2-4]</sup>。研究表明，miR-9 在多种恶性肿瘤中低表达，如口腔鳞状细胞癌<sup>[5]</sup>、慢性淋巴细胞白血病<sup>[6]</sup>、肝细胞癌<sup>[7]</sup>、宫颈腺癌<sup>[8]</sup>。有研究<sup>[9-10]</sup>发现 miR-9 在胃癌组织和胃癌细胞系中低表达，但是也

有研究<sup>[11-12]</sup>却表明 miR-9 在胃癌组织中高表达，尚需进一步阐明 miR-9 在胃癌中表达状况，以及调控胃癌增殖侵袭的作用机制。

笔者前期采用生物信息学数据库分析<sup>[13]</sup>发现，Bcl-2 相关永生基因 4 (Bcl-2 associated athanogene 4, BAG4) 的 3'UTR 和 miR-9 存在互补结合序列 (图 1)，故预测 BAG4 可能是 miR-9 的潜在靶基因。此外，笔者的研究还发现 BAG4 在胃癌组织中高表达，与胃癌患者临床病理特征参数及不良预后密切相关，PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B/ZEB1 轴促进胃癌细胞的迁移和侵袭。目前尚未检索到 miR-9 靶向调控 BAG4 表达的报道。为此，本研究旨在探讨 miR-9 对胃癌细胞增殖和侵袭的影响，以及其与 BAG4 的调控关系，为胃癌的靶向治疗寻找新的理论依据。

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context-++ score
Position 25-31 of BAG4 3' UTR hsa-miR-194-50	5' ...GAACAAAGUGGAAGC-CUGUUACU... 3' GGUGUACCUCAACGACAAUGU	7mer-m8	-0.28
BAG4' UTR WT	5'-GAACAAAGUGGAAGCCUGUUACU		
Has-miR-9	5'-AGGUGUACCUCAACGACAAUGU		
BAG4' UTR MUT	3'-GAACAAAGUGGAAGCGACAAUGU		

图 1 TargetScan 数据库预测 miR-9 和 BAG4 之间结合位点

Figure 1 The binding site between miR-9 and BAG4 predicted by TargetScan database

## 1 材料与方法

### 1.1 新鲜胃癌组织

选取兰州大学第一医院 2014 年 1 月—2015 年 6 月收治的 80 例胃癌组织标本及配对的癌旁组织，所有标本手术切除尽快保存于 -80 °C 液氮罐中。所有患者病理组织学检查均证实为胃癌，术前均未接受化疗、放疗和分子靶向治疗，所有患者均有完整的临床病理资料和随访资料。本研究经过兰州大学第一医院伦理委员会批准通过 (审批号: LDYYLL2020-120)。

### 1.2 主要试剂

胎牛血清和 RPMI 1640 培养基均购自美国 Gibco 公司，胰蛋白酶和青链霉素购自北京索来宝科技公司。TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。U6 和 miR-9 引物、miR-9 模拟物、miR-9 抑制物及对照质粒由广州锐博生物科技公司合成。Transwell 小室和 PVDF 膜购自美国 Millipore 公司，Matrigel 基质胶购自美国 BD Biosciences 公司。荧光素报告基因试

剂购自美国 Promega 公司，Lipfectamine™ 3000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司。CCK-8 试剂盒、蛋白定量 BCA 试剂盒、蛋白酶抑制剂、蛋白上样缓冲液购自上海碧云天生物科技有限公司。BAG4 抗体购于英国 Abcam 公司， $\beta$ -actin 和二抗抗体购自美国 Proteintech 公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞培养及转染** 人胃癌细胞系 MGC803、BGC823、SGC7901、AGS、MKN-45 及人胃黏膜上皮细胞 (GES-1) 购于中国科学院上海生科院细胞资源中心。人胃癌细胞置于细胞孵育箱常规培养，定期换液并传代，收集处于对数生长期的胃癌细胞用于后续实验。将 MKN-45 和 MGC803 胃癌细胞接种于 6 孔板中， $1 \times 10^5$  个/mL/孔。当细胞汇合度达到 40%~50% 时，用 Lipfectamine™ 3000 转染试剂分别将 miR-9 模拟物和对照序列转染至 MGC803 细胞中，将 miR-9 抑制物、对照序列、si-BAG4、miR-9 抑制物+si-BAG4 分别瞬时转染至 MKN-45 或 MGC803

胃癌细胞中, 转染6 h后将不含血清和双抗的培养液更换为含10%胎牛血清和双抗的培养液, 24 h后检测转染效率, 转染成功的细胞用于后续实验。

**1.3.2 qRT-PCR法检测miR-9和靶基因的表达水平** 使用TRIzol试剂从胃癌细胞系和组织标本中提取总RNA, 并采用超微量分光光度计检测RNA的浓度, RNA反转录使用PrimeScript™ RT reagent Kit购自日本TaKaRa公司。采用实时荧光定量PCR试剂盒SYBR® Premix Ex Taq™配制PCR反应体系, 反应条件按照说明书进行。检测miR-9和靶基因的表达水平。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-9和BAG4的相对表达水平, 其中 $\Delta Ct = Ct_{miR-9} - Ct_{U6}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \text{样本}\Delta Ct - \text{阴性对照}\Delta Ct$ 。以U6为内参计算各组细胞miR-9的相对表达量。

**1.3.3 CCK-8检测细胞增殖能力** 取各组处于对数生长期的胃癌细胞, 将细胞密度调控为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ , 并将其接种于96孔板(100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ), 每组设置3个复孔, 每孔加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8溶液, 在细胞孵育箱中培养2 h, 分别培养0、24、48、72、96 h后, 分别应用酶标仪检测波长在450 nm处的光密度值, 以反映各组细胞的增殖能力, 绘制各组细胞的生长曲线。

**1.3.4 克隆形成检测细胞增殖能力** 将各组细胞接种于6孔板, 每孔加入500个胃癌细胞, 每组3个复孔, 常规培养10~14 d, 当出现肉眼可见的克隆(即>50个细胞的集落)时即终止培养。加入4%多聚甲醛溶液固定细胞15 min, 用结晶紫染色20 min, PBS清洗3次, 拍照并统计各组的克隆数目。

**1.3.5 Transwell侵袭实验检测胃癌细胞的侵袭能力** 将Matrigel基质胶与不含血清的RPMI 1640混匀后, 均匀涂抹于Transwell小室上层, 取处于对数生长期的细胞, 将细胞接种于Transwell小室上室, 上层内加入200  $\mu\text{L}$ 不含胎牛血清的RPMI 1640培养液, 在小室下层内加入600  $\mu\text{L}$ 含10%胎牛血清的培养液, 常规培养24 h。用4%多聚甲醛固定细胞20 min, 再用结晶紫染液染色15 min, 用PBS冲洗干净残余染液, 用棉签擦拭干净未穿过Transwell小室上室的细胞, 显微镜下随机选取5个视野拍照并计数, 统计每组样品中穿过Transwell小室滤膜的数目。

**1.3.6 荧光素酶报告基因实验检测miR-9与BAG4间的表达关系** 委托广州锐博生物科技公司构建并合成BAG4野生型(WT)及突变型(MUT)荧光素酶报告基因质粒。将处于对数生长期的胃癌细

胞, 接种于24孔板中, 利用Lipfectamine™ 3000将WT-BAG4荧光质粒、MUT-BAG4荧光质粒、miR-9模拟物及对照分别转染至MGC803细胞, 将WT-BAG4荧光质粒、MUT-BAG4荧光质粒、miR-9抑制物及阴性对照分别转染至MKN-45细胞, 按照说明书进行转染。转染48 h后, 按照荧光素酶报告基因测定系统检测各组细胞荧光素酶的活性。

**1.3.7 Western blot检测胃癌细胞中BAG4蛋白的表达水平** 提取各组细胞的总蛋白, BCA法检测各组样品的蛋白浓度, 待测样品中加入蛋白上样缓冲液, 加至10%SDS-PAGE凝胶中进行电泳, 分离后的蛋白条带转移至PVDF膜上, 在室温下用5%脱脂奶粉封闭2 h, 分别加入兔抗人BAG4单克隆抗体和鼠抗人 $\beta$ -actin单克隆抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBST洗膜后, 然后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或山羊抗鼠IgG, 室温孵育1 h, 充分清洗后, 加入ECL发光液显影, 全自动凝胶成像仪分析各组细胞的灰度值, 以 $\beta$ -actin为内参, 比较各组蛋白的相对表达量。

## 1.4 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计分析, 采用 $\chi^2$ 检验分析miR-9的表达水平与胃癌患者临床病理特征参数之间的相关性, Log-rank法比较miR-9的表达水平与胃癌患者总生存率的差异, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两组组间比较采用非配对 $t$ 检验, 多组组间比较采用单因素方差分析, 采用GraphPad Prism 6软件绘图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-9在胃癌组织中的表达及其与患者临床病理特征的关系

采用qRT-PCR法检测40例癌旁组织和80例胃癌组织中miR-9的表达水平结果显示, 胃癌组织中miR-9的相对表达量明显低于相应癌旁组织( $1.105 \pm 0.08$  vs.  $1.736 \pm 0.16$ ,  $P < 0.001$ ) (图2)。miR-9表达与胃癌患者临床病理特征的关系分析结果显示, miR-9的表达与患者的性别( $P = 0.597$ )、年龄( $P = 0.600$ )、肿瘤部位( $P = 0.884$ )、分化程度( $P = 0.412$ )无关, 而与胃癌患者的肿瘤大小( $P = 0.024$ )、肿瘤浸润深度( $P = 0.045$ )、淋巴结转移( $P = 0.013$ )、远处转移( $P = 0.019$ )和TNM分



期 ( $P=0.013$ ) 明显有关 (表1)。生存分析结果显示, miR-9 高表达患者总生存率明显高于 miR-9 低表达患者 ( $P=0.028$ ) (图3)。

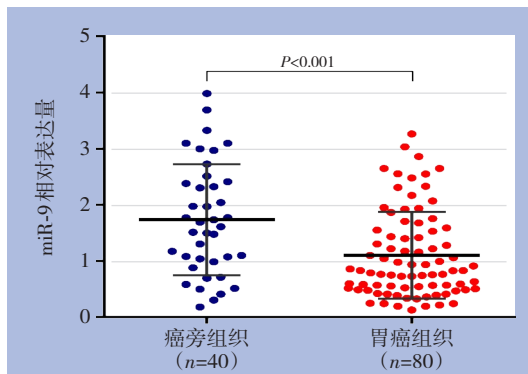


图2 miR-9在胃癌与癌旁组织中的表达

Figure 2 Expression of miR-9 in gastric cancer and adjacent non-cancerous tissues

表1 miR-9表达与患者临床病理特征的关系[n (%) ]

Table 1 Relationship between miR-9 expression and clinicopathological characteristics of patients [n (%)]

特征	低表达(n=35)	高表达(n=45)	P
性别			
男	26(74.5)	31(68.9)	0.597
女	9(25.7)	14(31.1)	
年龄(岁)			
<60	23(65.7)	27(60.0)	0.600
≥60	12(34.3)	18(40.0)	
肿瘤部位			
近端+中部	13(37.1)	16(35.6)	0.884
远端	22(62.9)	29(64.4)	
组织学分级			
G1+G2	8(22.9)	14(31.1)	0.412
G3	27(77.1)	31(68.9)	
肿瘤大小(cm)			
<5	24(68.6)	40(88.9)	0.024
≥5	11(31.4)	5(11.1)	
T分期			
T1~T2	8(22.9)	20(44.4)	0.045
T3~T4	27(77.1)	25(55.6)	
N分期			
N0	9(25.7)	24(53.3)	0.013
N1~N3	26(74.3)	21(46.7)	
M分期			
M0	31(88.6)	45(100.0)	0.019
M1	4(11.4)	0(0.0)	
TNM分期			
I+II	17(48.6)	34(75.6)	0.013
III+IV	18(51.4)	11(24.4)	

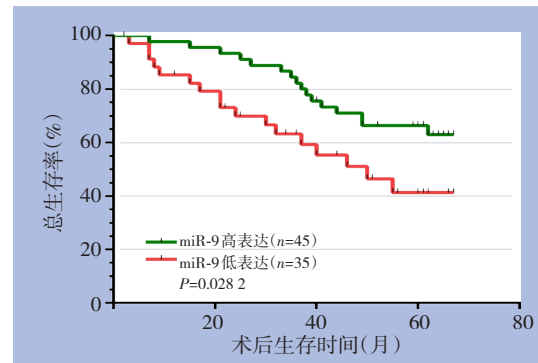


图3 miR-9高表达与低表达患者的生存曲线

Figure 3 Survival curves of patients with high and low miR-9 expression

## 2.2 miR-9表达对胃癌细胞增殖的影响

采用qRT-PCR法检测miR-9在5个胃癌细胞系中的表达,结果显示,与正常的胃黏膜上皮细胞GES-1相比,miR-9在SGC7901、BGC823、AGS、MKN-45和MGC803细胞中的表达水平均明显下调(均 $P<0.05$ ) (图4A)。基于上述实验结果,选择MKN-45和MGC803进行后续实验。将miR-9抑制物转染至MKN-45后,通过qRT-PCR法检测转染效率,结果显示,与对照组相比,转染miR-9抑制物明显降低了胃癌细胞MKN-45中miR-9的表达水平( $P<0.01$ ),而转染miR-9模拟物可明显升高MGC803细胞中miR-9的表达水平( $P<0.001$ ) (图4B-C)。鉴于临床数据结果表明miR-9的表达水平与肿瘤大小密切相关。敲低或过表达胃癌细胞miR-9的表达水平后,采用CCK-8法检测各组胃癌细胞增殖能力的变化(图5A-B)。结果显示,与对照组相比,miR-9抑制物组MKN-45的增殖能力明显增加,而miR-9模拟物组MGC803的增殖能力明显降低(均 $P<0.05$ )。采用克隆形成实验进一步验证miR-9的表达水平对胃癌细胞增殖能力的影响,结果显示,与对照组胃癌细胞相比,MKN-45胃癌细胞转染miR-9抑制物后,细胞集落形成数量明显增加,MGC803胃癌细胞转染miR-9模拟物后,细胞集落形成数量明显降低(均 $P<0.001$ ) (图5C-D)。

## 2.3 miR-9对胃癌细胞侵袭能力的影响

采用Transwell侵袭实验分析miR-9的表达水平对胃癌细胞侵袭能力的影响。结果显示,与对照组相比,miR-9抑制物转染至胃癌细胞MKN-45后,胃癌细胞的侵袭数量明显增加,而转染miR-9模拟物后,MGC803胃癌细胞组的侵袭数量明显下降(均 $P<0.001$ ) (图6)。

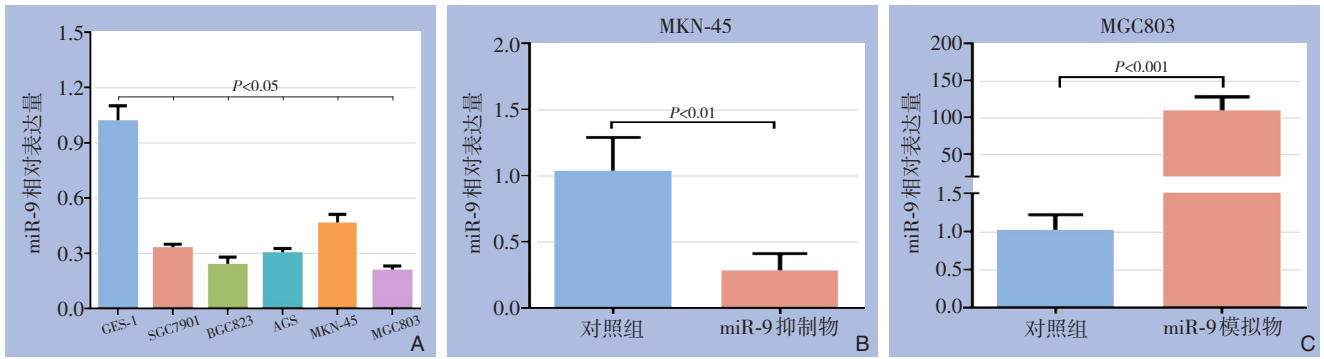


图 4 qRT-PCR 法检测 miR-9 的表达 A: miR-9 在 GES-1 和五种胃癌细胞系中的表达; B: MKN-45 细胞转染 miR-9 抑制物后 miR-9 的表达; C: MGC803 细胞转染 miR-9 模拟物后 miR-9 的表达

Figure 4 Expression of miR-9 detected by qRT-PCR A: Expression of miR-9 in GES-1 and five gastric cancer cell lines; B: Expression of miR-9 in MKN-45 cells after transfection with miR-9 inhibitors; C: Expression of miR-9 in MGC803 cells after transfection with miR-9 mimics

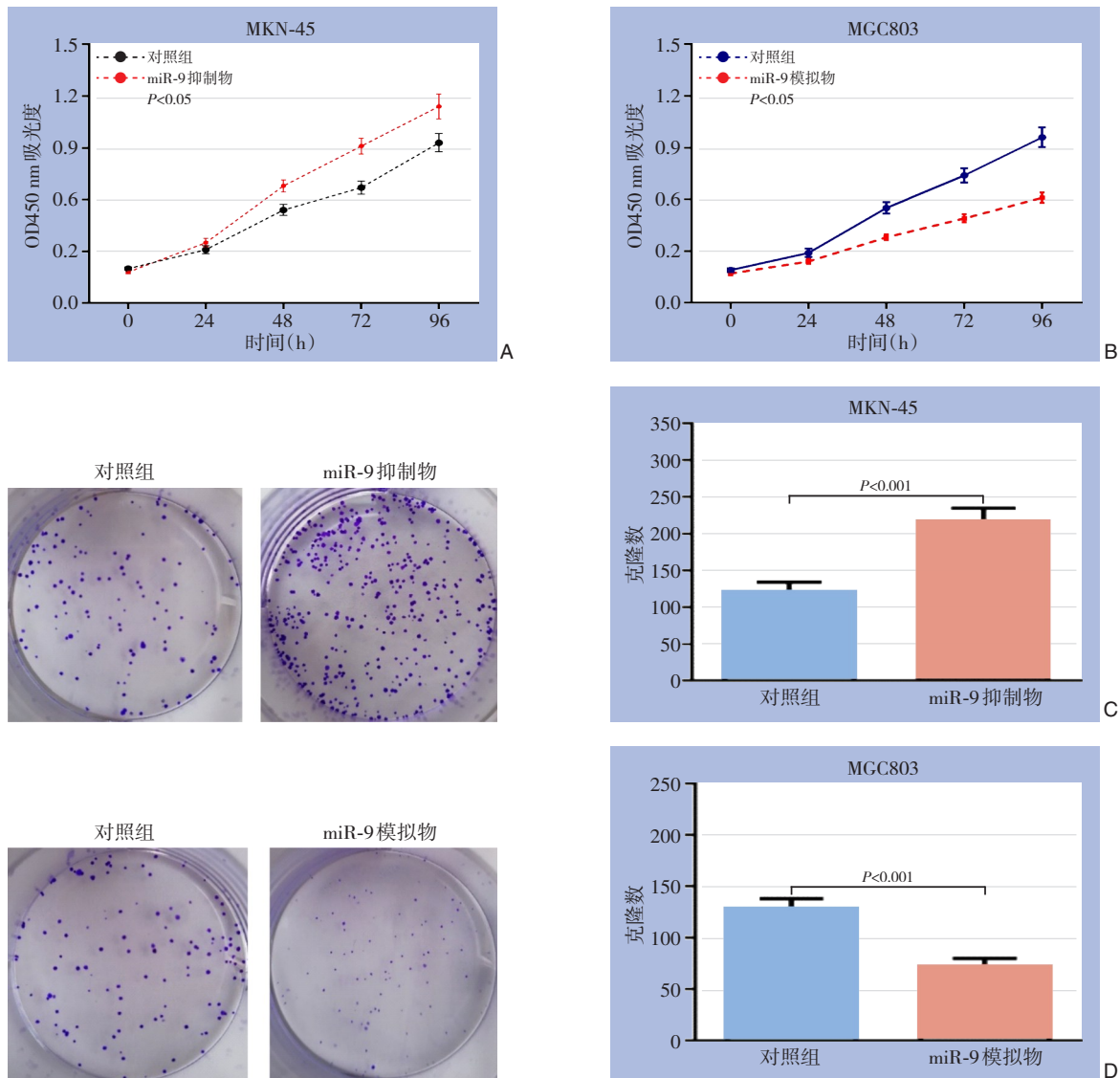


图 5 胃癌细胞增殖能力检测 A-B: CCK-8 法检测 miR-9 敲低和过表达对胃癌细胞增殖能力的影响; C-D: 克隆形成试验检测 miR-9 敲低和过表达对胃癌细胞增殖能力的影响

Figure 5 Detection of proliferation ability in gastric cancer cells A-B: Effect of miR-9 knockdown and overexpression on the proliferation ability of gastric cancer cells detected by CCK-8 assay; C-D: Effect of miR-9 knockdown and overexpression on the proliferation ability of gastric cancer cells detected by colony formation assay

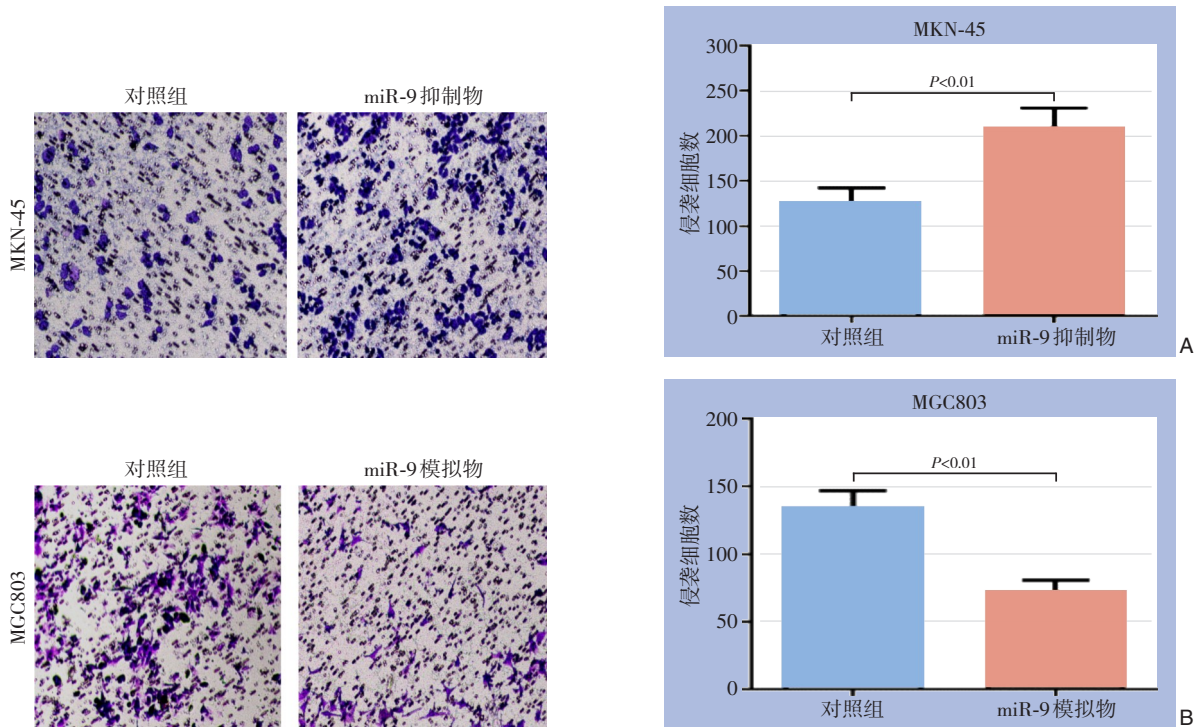


图6 Transwell小室检测胃癌细胞侵袭能力 A: miR-9敲低对胃癌细胞侵袭能力的影响; B: miR-9过表达对胃癌细胞侵袭能力的影响

Figure 6 Detection of gastric cancer cell invasion ability using Transwell assay A: Effect of miR-9 knockdown on the invasion ability of gastric cancer cells; B: Effect of miR-9 overexpression on the invasion ability of gastric cancer cells

2.4 荧光素酶报告基因实验分析 miR-9 与 BAG4 的关系

荧光素酶报告基因检测结果显示, WT-BAG4 与 miR-9 模拟物共转染组荧光素酶的活性低于对照组+WT-BAG4 ( $P<0.01$ ), MUT-BAG4 质粒与 miR-9 模拟物共转染组荧光素酶的活性与对照组+MUT-BAG4 荧光素酶活性, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

与之相反, WT-BAG4 与 miR-9 抑制物共转染组荧光素酶的活性高于对照组+WT-BAG4 ( $P<0.01$ ), 而 MUT-BAG4 质粒与 miR-9 模拟物共转染组荧光素酶的活性与对照组+MUT-BAG4 荧光素酶活性, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ) (图7)。上述结果验证 BAG4 是 miR-9 潜在的靶基因。

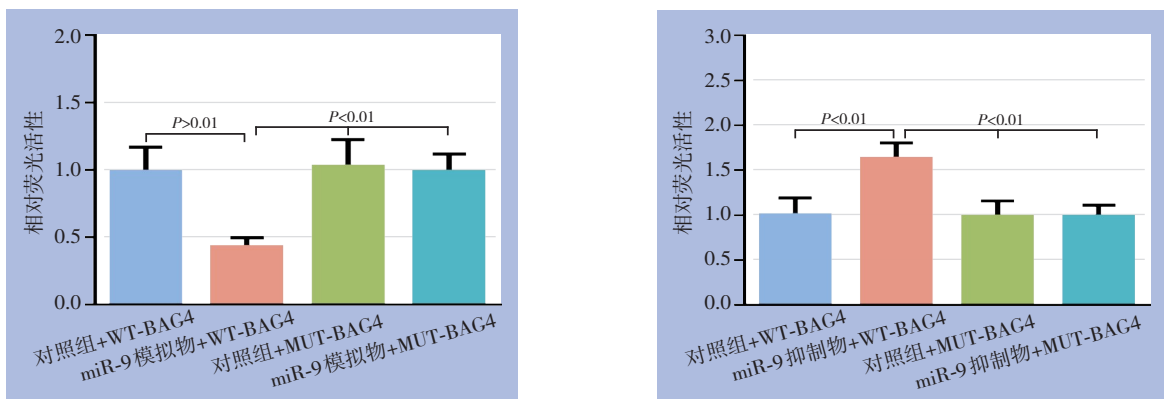


图7 双荧光素酶报告基因检测 miR-9 与 BAG4 的靶向关系

Figure 7 Dual-luciferase reporter assay to detect the targeting relationship between miR-9 and BAG4

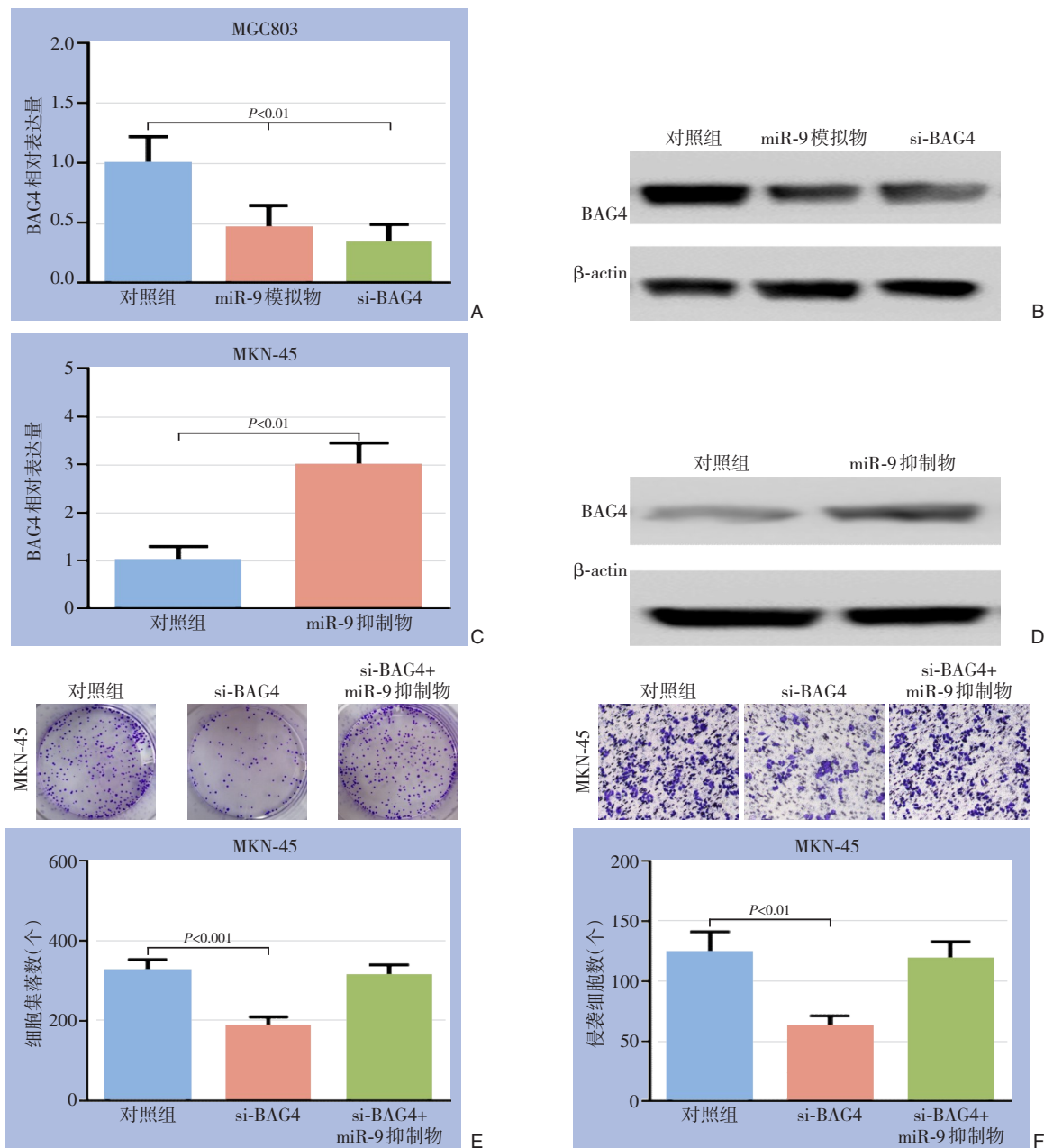
2.5 miR-9 靶向调控 BAG4 的验证

MGC803 胃癌细胞中分别瞬时转染 miR-9 模拟

物和 si-BAG4 后, 采用 qRT-PCR 和 Western blot 的方法分别检测 BAG4 mRNA 和蛋白的表达量, 与对照

组相比, miR-9模拟物和 si-BAG4组 BAG4 mRNA和蛋白的表达量均下降; 而MKN-45胃癌细胞中转染 miR-9抑制物后, 与对照组相比, BAG4 mRNA和蛋白表达明显增加(均  $P < 0.01$ ) (图 8A-D)。进一步采用克隆形式实验比较了各组细胞的增殖能力, 结果显示, 与对照组相比, MKN-45胃癌细胞转染 si-BAG4后, 细胞集落形成数量明显减少 ( $P < 0.001$ );

共同转染 si-BAG4+miR-9抑制物组和对照组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。采用Transwell侵袭实验比较了各组细胞的侵袭能力, 与对照组相比, MKN-45胃癌细胞转染 si-BAG4后, 胃癌细胞的侵袭数量明显减少 ( $P < 0.01$ ); 共同转染 si-BAG4+miR-9抑制物组和对照组相比, 侵袭细胞数量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 8E-F)。



**图8 miR-9靶向调控BAG4的验证** A-B: qRT-PCR与Western blot检测转染miR-9模拟物和si-BAG4后胃癌细胞的BAG4表达水平; C-D: qRT-PCR与Western blot检测转染miR-9抑制物后胃癌细胞的BAG4表达水平; E-F: 克隆形成试验和Transwell侵袭实验检测转染si-BAG4或si-BAG4与增殖和miR-9抑制物共转染后胃癌细胞增殖与侵袭能力的变化

**Figure 8 Validation of miR-9 targeting regulation of BAG4** A-B: BAG4 expression levels in gastric cancer cells detected by qRT-PCR and Western blot after transfection with miR-9 mimics and si-BAG4; C-D: BAG4 expression levels in gastric cancer cells detected by qRT-PCR and Western blot after transfection with miR-9 inhibitors; E-F: Changes in proliferation and invasion abilities of gastric cancer cells detected by colony formation assay and Transwell invasion assay after transfection with si-BAG4 or co-transfection with si-BAG4 and miR-9 inhibitors



### 3 讨论

miRNA 是一类微小的单链非编码 RNA, 大约含有 22 个核苷酸, miRNA 通过与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合, 可导致 mRNA 降解或翻译抑制, 是基因表达的重要反式调控因子, 在基因转录后表达水平调控方面发挥关键作用<sup>[14]</sup>。已有研究<sup>[2]</sup>表明, miRNA 在许多生物学过程中发挥关键作用, 包括细胞生长、凋亡、增殖和分化。近年来的研究<sup>[3]</sup>表明, 异常表达的 miRNA 参与了肿瘤的发生发展和侵袭转移。迄今为止, 胃癌发生发展及侵袭转移的分子机制尚未阐明, 近年来的研究发现 miR-9 在胃癌组织中异常表达, 参与调控胃癌的增殖、迁移和侵袭, 但是各研究结果不一致。Luo 等<sup>[9]</sup>研究发现 miR-9 在胃癌组织中低表达。Zheng 等<sup>[10]</sup>研究显示, miR-9 在胃癌组织和胃癌细胞系中表达下调, 过表达 miR-9 抑制胃癌细胞的增殖、侵袭和转移, 敲低 miR-9 可促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭。Gao 等<sup>[15]</sup>研究发现, miR-9 在胃癌组织和胃癌细胞系中均低表达, 过表达 miR-9 可以显著抑制胃癌细胞的增殖, 体内动物实验发现抑制肿瘤的生长。Meng 等<sup>[16]</sup>也发现过表达 miR-9 抑制胃癌细胞的侵袭能力。Hang 等<sup>[17]</sup>研究发现过表达 miR-9-5p 抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭。Fan 等<sup>[18]</sup>也表明, miR-9-5p 在胃癌细胞和患者血浆中均低表达。但是, 也有研究<sup>[11-12]</sup>结果却显示 miR-9 在胃癌组织中高表达。上述研究存在差异可能的原因有: (1) 肿瘤的异质性; (2) 样本量的大小; (3) miR-9 成熟体由 miR-9-1、miR-9-2、miR-9-3 三个独立的基因编码, 这三个基因分别定位位于 1、5 和 15 号染色体, 具有促癌或抑癌双向调控作用, 在不同的肿瘤组织其表达及作用可能不尽相同<sup>[19]</sup>; (4) miR-9 低表达可能归因于编码 miR-9 基因启动子区域异常的高甲基化<sup>[20]</sup>。本研究检测了 80 例胃癌组织中 miR-9 的表达水平, 结果也显示 miR-9 在胃癌组织和胃癌细胞系中低表达, 抑制胃癌细胞的增殖和侵袭。研究结果也与 Meng 等研究<sup>[16]</sup>一致, miR-9 的表达水平与胃癌患者的预后呈负相关, 提示 miR-9 低表达可能是胃癌不良预后的标记物。

Bracken 等研究<sup>[4]</sup>表明, 某一 miRNA 可以同时调控多个靶基因, miR-9 的功能和靶基因也具有肿瘤特异性, 这取决于胃癌细胞所处的环境。Zheng 等<sup>[10]</sup>研究表明, miR-9 通过调控 cyclin D1 和 Ets1 的

表达, 抑制胃癌的增殖、侵袭和转移, 敲除 cyclin D1 或 Ets1 可部分恢复 miR-9 过表达的作用。Gao 等<sup>[15]</sup>研究提示, TNFAIP8 可能是 miR-9 的靶基因, 过表达 miR-9 显著下调 TNFAIP8 的表达, miR-9 可通过调控 TNFAIP8 的表达调控胃癌细胞的增殖。Hang 等<sup>[17]</sup>研究发现过表达 miR-9-5p 可降低胃癌细胞中神经腺苷 1 (NRP-1) 的表达, 双荧光素酶报告基因检测结果显示 miR-9-5p 可直接靶向 NRP-1, miR-9-5p 通过调控 NRP-1 的表达抑制胃癌细胞的增殖和侵袭。Fan 等<sup>[18]</sup>研究发现, miR-9-5p 通过直接调控 TNFAIP8L3 的表达来抑制胃癌细胞的迁移。笔者的研究率先报道 miR-9 通过靶向调控 BAG4 的表达, 抑制胃癌的增殖和侵袭, 这为胃癌的防治提供了新的理论依据。

已有研究<sup>[13, 21]</sup>表明 BAG4 可促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭。Rho 等<sup>[22]</sup>研究也发现 BAG4 在结肠癌中高表达, 可作为早期诊断结肠癌的血清标记物。Annunziata 等<sup>[23]</sup>研究也提示 BAG4 的异常表达与卵巢癌的恶性侵袭相关。Davidson 等<sup>[24]</sup>检测了 410 例淋巴结阴性乳腺癌组织中 BAG4 的表达, 发现 BAG4 在乳腺癌组织中高表达, 是乳腺癌不良预后的独立危险因素。本研究发现敲低 MNK-45 胃癌细胞中 BAG4 的表达后, Transwell 侵袭实验发现 MNK-45 细胞的侵袭能力下降。上述研究均表明 BAG4 在多种恶性肿瘤中均发挥着促癌基因的作用。

综上所述, miR-9 在胃癌组织和胃癌细胞系中低表达, 通过靶向抑制 BAG4 的表达, 抑制胃癌细胞的增殖和侵袭能力, miR-9 有望成为胃癌潜在的治疗靶点和预后判断的标记物。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明: 王军负责实验项目设计、数据统计分析、论文撰写; 陈燕、闵光涛负责收集临床数据资料、图表制作和实验技术指导; 朱俊亚、吕坤、乐奇负责实施细胞实验; 姜雷负责项目监督, 指导论文撰写。

### 参考文献

- [1] 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.

- [2] Croce C, Calin G. miRNAs, cancer, and stem cell division[J]. *Cell*, 2005, 122:6–7. doi: [10.1016/j.cell.2005.06.036](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.036).
- [3] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. microRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435(7043):834–838. doi: [10.1038/nature03702](https://doi.org/10.1038/nature03702).
- [4] Bracken CP, Scott HS, Goodall GJ. A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer[J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(12):719–732. doi: [10.1038/nrg.2016.134](https://doi.org/10.1038/nrg.2016.134).
- [5] Minor J, Wang XT, Zhang F, et al. Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas[J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(1):73–78. doi: [10.1016/j.oraloncology.2011.11.006](https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.11.006).
- [6] Wang LQ, Kwong YL, Kho CSB, et al. Epigenetic inactivation of miR-9 family microRNAs in chronic lymphocytic leukemia: implications on constitutive activation of NFκB pathway[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12:173. doi: [10.1186/1476-4598-12-173](https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-173).
- [7] Zhang JB, Cheng J, Zeng ZZ, et al. Comprehensive profiling of novel microRNA-9 targets and a tumor suppressor role of microRNA-9 via targeting IGF2BP1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39): 42040–42052. doi: [10.18632/oncotarget.5969](https://doi.org/10.18632/oncotarget.5969).
- [8] Zhang JB, Jia JQ, Zhao LJ, et al. Down-regulation of microRNA-9 leads to activation of IL-6/Jak/STAT3 pathway through directly targeting IL-6 in HeLa cell[J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(5):732–742. doi: [10.1002/mc.22317](https://doi.org/10.1002/mc.22317).
- [9] Luo HC, Zhang HB, Zhang ZZ, et al. Down-regulated miR-9 and miR-433 in human gastric carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28(1):82. doi: [10.1186/1756-9966-28-82](https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-82).
- [10] Zheng LD, Qi T, Yang DH, et al. microRNA-9 suppresses the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer cells through targeting cyclin D1 and Ets1[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55719. doi: [10.1371/journal.pone.0055719](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055719).
- [11] Shirmohammadi K, Sohrabi S, Jafarzadeh Samani Z, et al. Evaluation of altered expression of miR-9 and miR-106a as an early diagnostic approach in gastric cancer[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2018, 9(1):46–51. doi: [10.21037/jgo.2017.11.04](https://doi.org/10.21037/jgo.2017.11.04).
- [12] Zhang XH, Qian YQ, Li F, et al. microRNA-9 selectively targets LMX1A to promote gastric cancer cell progression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(2): 405–412. doi: [10.1016/j.bbrc.2018.09.101](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.101).
- [13] Jiang L, Chen Y, Min GT, et al. Bcl2-associated athanogene 4 promotes the invasion and metastasis of gastric cancer cells by activating the PI3K/AKT/NF-κB/ZEB1 axis[J]. *Cancer Lett*, 2021, 520:409–421. doi: [10.1016/j.canlet.2021.08.020](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.08.020).
- [14] Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2):281–297. doi: [10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5).
- [15] Gao HY, Huo FC, Wang HY, et al. microRNA-9 inhibits the gastric cancer cell proliferation by targeting TNFAIP8[J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(2):e12331. doi: [10.1111/cpr.12331](https://doi.org/10.1111/cpr.12331).
- [16] Meng QS, Xiang LQ, Fu JW, et al. Transcriptome profiling reveals miR-9-3p as a novel tumor suppressor in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37321–37331. doi: [10.18632/oncotarget.16310](https://doi.org/10.18632/oncotarget.16310).
- [17] Hang C, Yan HS, Gong C, et al. microRNA-9 inhibits gastric cancer cell proliferation and migration by targeting neuropilin-1[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(4): 2524–2530. doi: [10.3892/etm.2019.7841](https://doi.org/10.3892/etm.2019.7841).
- [18] Fan YY, Shi Y, Lin ZH, et al. miR-9-5p suppresses malignant biological behaviors of human gastric cancer cells by negative regulation of TNFAIP8L3[J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(10): 2823–2829. doi: [10.1007/s10620-019-05626-2](https://doi.org/10.1007/s10620-019-05626-2).
- [19] Tsai KW, Liao YL, Wu CW, et al. Aberrant hypermethylation of miR-9 genes in gastric cancer[J]. *Epigenetics*, 2011, 6(10): 1189–1197. doi: [10.4161/epi.6.10.16535](https://doi.org/10.4161/epi.6.10.16535).
- [20] Hildebrandt MAT, Gu J, Lin J, et al. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2010, 29(42):5724–5728. doi: [10.1038/onc.2010.305](https://doi.org/10.1038/onc.2010.305).
- [21] Yi L, Lv Z, Wang J, et al. Bcl-2 associated athanogene 4 promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells. *Mol Med Rep*. 2017, 16(4):3753–3760. doi: [10.3892/mmr.2017.7073](https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7073).
- [22] Rho JH, Ladd JJ, Li CI, et al. Protein and glycomic plasma markers for early detection of adenoma and colon cancer[J]. *Gut*, 2018, 67(3):473–484. doi: [10.1136/gutjnl-2016-312794](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312794).
- [23] Annunziata CM, Kleinberg L, Davidson B, et al. BAG-4/SODD and associated antiapoptotic proteins are linked to aggressiveness of epithelial ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(22 Pt 1): 6585–6592. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-07-0327](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0327).
- [24] Davidson B, Valborg Reinertsen K, Trinh D, et al. BAG-1/SODD, HSP70, and HSP90 are potential prognostic markers of poor survival in node-negative breast carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2016, 54:64–73. doi: [10.1016/j.humpath.2016.02.023](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.02.023).

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式:王军,陈燕,闵光涛,等. microRNA-9的表达及其负性调控 BAG4对胃癌细胞增殖与侵袭的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2024, 33(8): 1264–1273. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2024.08.008](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2024.08.008)

Cite this article as: Wang J, Chen Y, Min GT, et al. The expression of microRNA-9 and its negative regulation of BAG4 on the proliferation and invasion of gastric cancer cells[J]. *Chin J Gen Surg*, 2024, 33(8): 1264–1273. doi: [10.7659/j.issn.1005-6947.2024.08.008](https://doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2024.08.008)