

• 论 著 •

miR-335-5p 过表达对胃癌基因表达谱的影响 及筛选基因的验证研究^{*}

王宏伟¹, 赵雪灵¹, 王 蒙², 高夏青², 陈凤琴³, 宁 月², 李海龙^{2△}

1. 甘肃中医药大学附属医院检验科, 甘肃兰州 730020; 2. 甘肃中医药大学第一临床医学院, 甘肃兰州 730101;
3. 甘肃中医药大学附属医院功能科, 甘肃兰州 730020

摘 要:目的 探讨上调微小 RNA(miR)-335-5p 对胃癌细胞增殖和侵袭能力的影响, 研究并验证 miR-335-5p 过表达后胃癌细胞中差异表达的靶基因。方法 使用 miR-335-5p 慢病毒载体感染胃癌细胞, 通过嘌呤霉素筛选构建稳转细胞株, 采用 MTT 法和 Transwell 实验观察上调 miR-335-5p 对胃癌细胞增殖和侵袭能力的影响, 使用表达谱芯片筛选过表达 miR-335-5p 组和阴性对照组细胞之间差异表达的基因。使用 miRSystem 网站的生物信息学数据库进行 miR-335-5p 的靶基因预测, 以至少 3 个软件支持的基因与芯片筛选基因取得交集, 采用 DAVID 6.8 软件对 miR-335-5p 的靶基因开展京都基因与基因组百科全书信号通路富集分析, 并选择部分差异表达最明显的基因进行实验验证。结果 上调 miR-335-5p 表达可抑制胃癌细胞的增殖和侵袭能力, 表达谱芯片筛选结合生物信息学预测分析共获得 212 个 miR-335-5p 靶基因, 富集在 20 个肿瘤相关的信号通路中。选择其中的靶基因环腺苷酸反应元件结合蛋白 1(CREB1)、苏氨酸激酶 3(AKT3)、外被体包被蛋白 $\beta 2$ 亚基(COPB2)、芳香烃受体核易位蛋白 2(ARNT2)、转化生长因子(TGF)- $\beta 2$ 、Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因(KRAS)、血小板源性生长因子- β (PDGF- β)进行验证, 实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法结果表明, 过表达 miR-335-5p 后可抑制上述靶基因的表达($P < 0.05$)。结论 上调 miR-335-5p 的表达能抑制胃癌细胞的增殖和侵袭能力, 其机制与抑制其靶基因 CREB1、AKT3、COPB2、ARNT2、TGF- $\beta 2$ 、KRAS、PDGF- β 的表达有关。

关键词:微小 RNA-335-5p; 胃癌; 信号通路; 表达谱芯片

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.23.012

中图法分类号:R735.2

文章编号:1673-4130(2023)23-2874-07

文献标志码:A

Effect of miR-335-5p overexpression on gene expression profile and validation of selected genes in gastric cancer^{*}

WANG Hongwei¹, ZHAO Xueling¹, WANG Meng², GAO Xiaqing²,
CHEN Fengqin³, NING Yue², LI Hailong^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730020, China; 2. First Clinical Medical School, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730101, China;
3. Department of Function, Affiliated Hospital of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730020, China

Abstract: Objective To investigate the effects of up-regulation of microRNA (miR) -335-5p on the proliferation and invasion of gastric cancer cells, and to study and verify the differentially expressed target genes in gastric cancer cells after miR-335-5p overexpression. **Methods** Gastric cancer cells were infected with miR-335-5p lentivirus vector and screened by puromycin to establish a stable cell line. The effects of miR-335-5p upregulation on the proliferation and invasion of gastric cancer cells were observed by MTT assay and Transwell assay. The differentially expressed genes between the miR-335-5p overexpression group and the negative control group were screened by expression microarray. The target genes of miR-335-5p were predicted by the bioinformatics database of miRSystem website, and at least three genes supported by the software were intersected with the genes screened by microarray. DAVID 6.8 software was used to perform KEGG Encyclopedia of Genes and Genomes signaling pathway enrichment analysis of the target genes of miR-335-5p. The most

^{*} 基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(21JR7RA579); 甘肃省卫生行业科研项目(GSWSKY2022-25); 甘肃省中医药科研课题(GZKG-2022-53)。

作者简介: 王宏伟, 男, 主任医师, 主要从事临床检验及分子诊断相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: gslz860931@163.com。

significantly differentially expressed genes were selected for experimental verification. **Results** Overexpression of miR-335-5p inhibited the proliferation and invasion of gastric cancer cells. A total of 212 target genes of miR-335-5p were identified, which were enriched in 20 tumor-related signaling pathways. The target genes cyclic adenylylase response element binding protein 1 (CREB1), threonine kinase 3 (AKT3), exosome envelope protein beta 2 subunit (COPB2), aryl hydrocarbon receptor nuclear translocation protein 2 (ARNT2), transforming growth factor (TGF)- β 2, Kirsten rat sarcoma viral oncogene (KRAS), platelet-derived growth factor- β (PDGF- β) were selected for verification. The results of real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot showed that overexpression of miR-335-5p could inhibit the expression of the above target genes ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of miR-335-5p could inhibit the proliferation and invasion of gastric cancer cells, and the mechanism is related to the down-regulation of its target genes CREB1, AKT3, COPB2, ARNT2, TGF- β 2, KRAS and PDGF- β .

Key words: microRNA-335-5p; gastric cancer; signaling pathways; expression profiling chip

微小 RNA(miR)-335 位于染色体 7q32.2, 在胃癌的发生、发展中发挥了重要作用^[1]。有报道指出, miR-335-5p 在胃癌组织中表达下调, 与其启动子甲基化有关^[2]。miR-335-5p 抑制胃癌细胞的增殖和迁移, 并诱导细胞凋亡, 把胃癌细胞周期阻滞在 G1/S 期^[1]。临床病理分析显示, miR-335 低表达可能与胃癌发生发展有关, 可一定程度评估患者预后^[3]。为深入探究其调控胃癌细胞生物学行为的机制, 本研究构建了 miR-335-5p 过表达慢病毒载体并感染胃癌细胞, 然后选择人类全基因组表达谱芯片筛选过表达 miR-335-5p 的胃癌细胞与对照细胞之间差异表达的 mRNA, 并采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 和蛋白质印迹法(Western blot)验证。

1 材料与方法

1.1 材料来源 胃癌细胞 MGC-803 购自中科院上海细胞库。靶基因环腺苷酸反应元件结合蛋白 1 (CREB1)、苏氨酸激酶 3(AKT3)、外被体包被蛋白 β 2 亚基(COPB2)、芳香烃受体核易位蛋白 2(ARNT2)、转化生长因子(TGF)- β 2、Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因(KRAS)、血小板源性生长因子- β (PDGF- β)、GAPDH、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(二抗)购自 Immunoway 生物科技有限公司。

1.2 仪器与试剂 电泳和湿转仪(美国 Bio-rad 公司、DYCZ-24D), 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司、SpectraMax i3X), 凝胶成像仪(广州博鹭腾生物科技有限公司、GelView 6300Plus), PCR 扩增仪(美国 ABI 公司、ABI7500)。BCA 试剂、配胶试剂购自北京索莱宝科技有限公司; 增强型 ECL 发光试剂购自上海熠圣生物科技股份有限公司; miR-335-5p 的过表达和阴性对照慢病毒载体由上海吉凯基因技术有限公司采用 GV369 载体合成, 克隆位点为 BamHNI; miDETECTA Track miRNA qRT-PCR starter kit 购自广州锐博生物有限公司; 逆转录试剂盒购自上海翊圣生物科技股份有限公司; 高糖 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司), 胎牛血清(杭州四季青公司), 青链霉素双抗(北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中加入青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 U/mL), 在 37 °C、5%CO₂ 的细胞培养箱中常规培养。每隔 2~3 d 换完全培养基, 待细胞密度达 90% 左右时按 1:2 比例传代。取对数生长期的细胞用于下一步实验。

1.3.2 慢病毒载体感染胃癌细胞 培养胃癌 MGC-803 细胞至对数生长期, 消化细胞后用含有 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基重悬细胞后计数, 调成单细胞悬液, 接种在 6 孔板中, 置于 37 °C 培养箱中备用。待过夜后的细胞生长至 40%~50% 时, 用感染增强液稀释配备 1 $\times$ 10⁸ TU/mL 的病毒液。取 10 mg/mL polybrene 以 DMEM 培养基稀释至终浓度为 5 μ g/mL (指 1 mL 感染时体积), 备用。在 6 孔板中采用 1 $\times$ 10⁸ TU/mL 的病毒液感染胃癌细胞, 将培养体系混匀后继续培养 8~12 h 后, 观察细胞状态, 并更换为新鲜的培养基。感染 72 h 后, 观察荧光表达情况并拍照, 消化细胞接种至细胞培养瓶继续培养。待细胞生长至 70%~80% 时, 消化传代培养, 收集部分细胞, 提取 RNA, 逆转录后, 扩增并计算 miR-335-5p 水平, 以确定感染后细胞内 miR-335-5p 水平。

1.3.3 MTT 法检测过表达 miR-335-5p 对胃癌细胞增殖的影响 将稳转 miR-335-5p 和阴性对照的 MGC-803 细胞培养至对数生长期, 收集细胞后用不含有胎牛血清的高糖 DMEM 培养基重悬细胞后计数, 调成单细胞悬液, 以 200 μ L 体积加入 96 孔板, 使细胞数为 5 000 个/每孔, 置于 37 °C 培养箱过夜备用。待 24、48、72、96 h 后每组每孔加入 MTT 20 μ L, 继续孵育 4 h, 吸去上清液, 每孔加入二甲基亚砜 150 μ L, 振荡 10 min, 用酶标仪以 570 nm 波长检测各孔吸光度(A)。按 A 值计算各组的平均值, 实验重复 3 次。

1.3.4 Transwell 小室检测过表达 miR-335-5p 对胃癌细胞的迁移能力的影响 将成功转染 miR-335-5p 的胃癌细胞用不含血清的培养液制成 5 $\times$ 10⁴/mL 的悬液, 取 200 μ L 加入 Transwell 上室中, 在下室中加

入 500 μ L 含有 10% 胎牛血清的培养基。细胞在 37 $^{\circ}$ C 下培养 48 h。将小室内的培养基丢弃,加适量预冷磷酸盐缓冲液(PBS)将细胞洗涤 2 次,添加足够的 4% 细胞固定液将小室下侧细胞固定 2 min,将固定液倒掉并用 PBS 洗涤 2 次,随后用 100% 甲醇固定,25 min 后将甲醇倒掉并用适量的 PBS 将细胞洗涤 2 次,加 0.1% 的结晶紫在避光条件下进行 20 min 染色,结晶紫染液倒掉并用足量 PBS 洗涤细胞 2 次,随后用棉签小心将小室内侧细胞拭去,常温下放置 30 min,待其风干后于光学显微镜下观察拍照。随机选取 3 个视野进行拍照,以穿过小室细胞数代表细胞数量的迁移能力。

1.3.5 表达谱芯片筛选过表达 miR-335-5p 后胃癌细胞差异表达的基因 将稳转 miR-335-5p 和阴性对照细胞培养至对数生长期,收集细胞后提取总 RNA,采用 Agilent mRNA 表达谱芯片杂交分析,使用晶芯[®] cRNA 扩增标记试剂盒进行样品 RNA 的荧光标记,逆转录合成 1st-strand cDNA 和 2nd-strand cDNA。基因芯片杂交反应在 42 $^{\circ}$ C 温度下 16~20 h 完成,洗涤后,应用芯片扫描仪进行扫描。杂交芯片在扫描后,使用 Agilent G2565CA Microarray Scanner 软件扫描图像(TIFF 格式),扫描后的 TIFF 格式图片数据采用 Feature Extraction 提数软件进行预处理分析,然后采用 GeneSpring GX 软件,写入分组等参

数信息。进行每个样品的数据归一化和 QC 分析,然后计算基因表达差异和 *P* 值。

1.3.6 miRNA 靶基因预测和靶基因富集信号通路分析 使用 miRSystem 网站(<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/index.php>)中集成的 DIANA、miRanda、miRDB、miRWalk、PICTAR、PITA、RNA22、Targetscan 软件对 miR-335-5p 的靶基因进行预测,采用京都基因与基因组百科全书进行信号通路富集分析,选取至少 3 个软件支持的靶基因作为下一步分析的候选基因。并与 1.3.5 所述表达谱芯片筛选基因取得交集基因,然后将交集基因开展靶基因富集信号通路分析。

1.3.7 筛选基因 PCR 扩增检测 采用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA,检测 RNA 浓度和纯度(A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0),以 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性(28 S 和 18 S RNA 条带比值 ≥ 2.0)。提取完成后,进行逆转录反应,反应条件如下:37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s。然后进行 qRT-PCR,反应条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 10 s,变性 95 $^{\circ}$ C 15 s,退火 60 $^{\circ}$ C 20 s,40 个循环。扩增反应结束后进行溶解曲线分析,判断产物是否有非特异性扩增;分析扩增曲线,计算 Ct 值,以 β -actin 作为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组间 mRNA 水平差异(模型组基因水平设为 1)。实验重复 3 次,引物合成由大连宝生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物

基因名称	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')	产物长度(bp)
CREB1	TGGGAAGCTGGGTGTACGTG	CATCAAGGCTCTGGTTGCCT	176
PDGF- β	TGGGAAGCTGGGTGTACGTG	GTCCTTACGGTCATAGGCGG	176
KRAS	CTGCTTAGCTTCCTGGGCAT	CCACACACACTCCATCCACA	135
TGF- β 2	TGGATGCGGCCTATTGCTTTA	CCAGCACAGAAGTTGGCATTGTA	106
ARNT2	GAAGACGCTGATGTGGGACAA	ATGCCGGGATAAGAACTCTGTG	119
AKT3	CTTCTCTGGAGTAAACTGGCAA	CTTCTCTGGAGTAAACTGGCAA	175
COPB2	GTGGGGACAAGCCATACCTC	GTGCTCTCAAGCCGGTAGG	211
β -actin	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	150

1.3.8 Western blot 收集各组处理的细胞,提取总蛋白,加入蛋白裂解液(RIPA:PMSF 为 100:1)提取总蛋白,将蛋白煮沸变性后,以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳将蛋白分离,湿转至聚偏氟乙烯膜上,以 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h,一抗孵育过夜(CREB1、AKT3、COPB2、ARNT2、TGF- β 2、KRAS、PDGFB、GAPDH 1:500~1:1 000 稀释),TBST 洗膜 3 次,二抗孵育 2 h(羊抗兔,1:2 000 稀释),TBST 洗膜 3 次,加入 ECL 于 Bio-rad 凝胶成像仪中进行反应,实验重复 3~5 次,采用 Image J 软件对 Western blot 结果进行定量分析,灰度值以累积吸光度值表示,结果以目的蛋白与 GAPDH 的累积吸光度的比值表示。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理和分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表

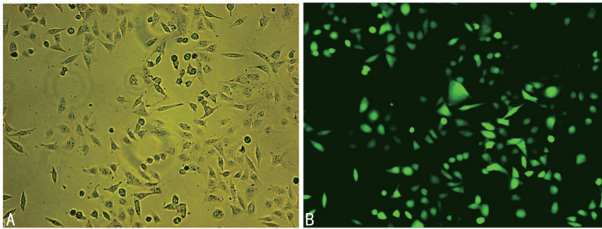
示,组间比较采用单因素方差分析;计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 慢病毒感染效果的观察及检测 慢病毒 miR-335-5p 感染 MGC-803 细胞 72 h 后在倒置荧光显微镜镜下观察,结果显示绿色荧光细胞占全视野细胞在 80% 以上,见图 1。qRT-PCR 结果显示,慢病毒 miR-335-5p 感染 MGC-803 细胞 72 h 后,MGC-803 细胞中 miR-335-5p 水平(130.74 ± 2.67)较阴性对照组(1.00 ± 0.11)明显升高($P < 0.05$),见图 2。

2.2 过表达 miR-335-5p 对胃癌细胞增殖的影响 MTT 结果显示,与阴性对照组比较,miR-335-5p 组细胞的 48、72、96 h 的 *A* 值均明显降低,差异有统计

学意义($P<0.05$),表明 miR-335-5p 可降低胃癌细胞活力、抑制其增殖,见图 3。



注:A为明场下细胞(×100);B为暗场下细胞(×100)。

图 1 被感染细胞倒置荧光显微镜镜下图

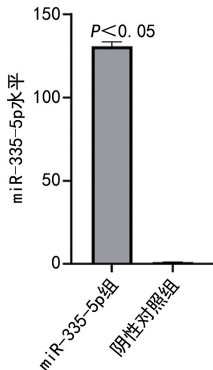
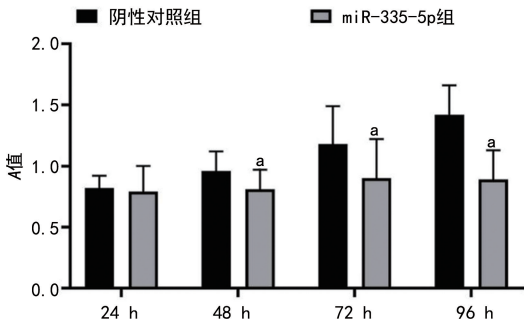


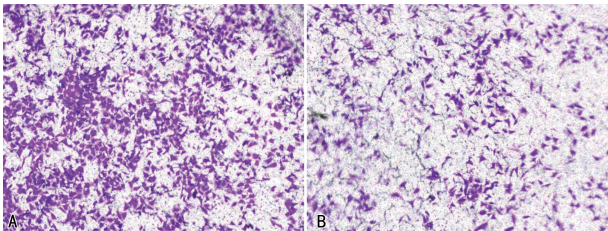
图 2 各组 miR-335-5p 水平比较



注:与同时段阴性对照组比较,^a $P<0.05$ 。

图 3 过表达 miR-335-5p 对胃癌细胞增殖的影响

2.3 过表达 miR-335-5p 对胃癌细胞侵袭能力的影响 Transwell 结果显示,与阴性对照组比较,miR-335-5p 组细胞数明显减少,差异均有统计学意义($P<0.05$),表明过表达 miR-335-5p 可抑制胃癌细胞的侵袭能力。见图 4。



注:A为阴性对照组;B为 miR-335-5p 组。

图 4 慢病毒 miR-335-5p 感染 MGC-803 细胞 72 h 后倒置荧光显微镜观察结果(×100)

2.4 表达谱芯片筛选差异基因和富集信号通路分析 表达谱芯片研究发现,miR-335-5p 稳转细胞和阴性对照细胞之间差异表达的基因(FC 大于 2.0 倍)有

1 713 个。生物信息学研究表明,经 DIANA、miRanda、miRDB、miRWalk、RNAhybrid、PICTAR4、PICTAR5、PITA、RNA22 和 Targetscan 软件共同预测 miR-335-5p 的靶基因,其中至少 3 个软件支持的靶基因有 3 013 个,将所得基因与表达谱芯片筛选的差异基因取交集,获得交集基因 212 个,并将获得的交集基因运用 DAVID 6.8 软件进行富集分析,共富集到 20 条信号通路,其中绝大部分为与肿瘤生物学有关的信号通路,如 TGF- β 通路、mTOR 通路、凋亡通路、p53 信号通路等均为调控肿瘤生物学表型的重要通路。见图 5。

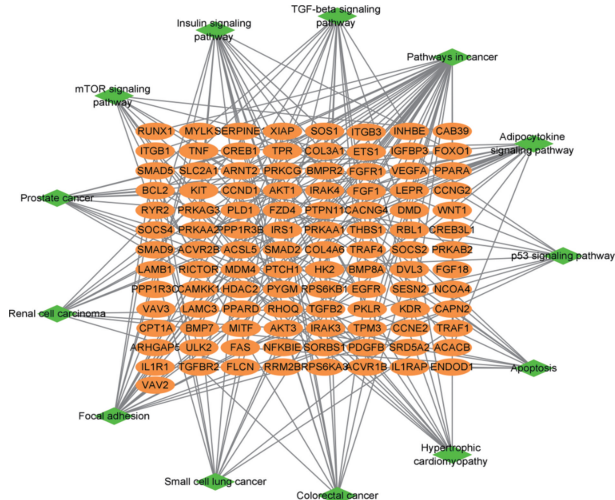
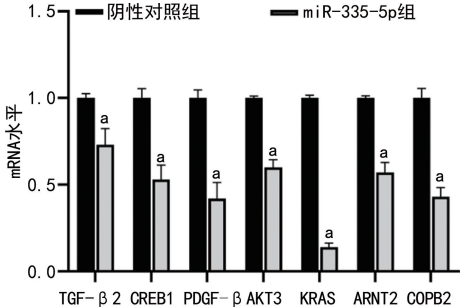


图 5 富集在与肿瘤密切相关的信号通路中的交集基因

2.5 靶基因 CREB1、AKT3、COPB2、ARNT2、TGF- β 2、KRAS、PDGF- β 的 mRNA 表达情况 为验证感染慢病毒 miR-335-5p 和阴性对照的 MGC-803 后胃癌细胞中筛选靶基因在蛋白水平上的表达情况,选择表达谱芯片筛选后差异表达的核心基因进行验证。qRT-PCR 实验验证结果表明,相对于阴性对照组,相关靶基因 CREB1 (0.53 ± 0.08)、AKT3 (0.60 ± 0.05)、COPB2 (0.43 ± 0.05)、ARNT2 (0.57 ± 0.07)、TGF- β 2 (0.73 ± 0.09)、KRAS (0.14 ± 0.03)、PDGF- β (0.42 ± 0.07) 的 mRNA 水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 6。



注:与阴性对照组比较,^a $P<0.05$ 。

图 6 胃癌细胞中过表达 miR-335-5p 后筛选靶基因的 mRNA 表达情况

2.6 靶基因 CREB1、AKT3、COPB2、ARNT2、TGF-

β2、KRAS、PDGF-β 的蛋白表达情况 Western blot 结果表明,与阴性对照组比较,相关靶基因 CREB1 (0.20±0.01)、COPB2(0.40±0.02)、AKT3(0.30±0.01)、ARNT2(0.49±0.01)、TGF-β2(0.21±0.00)、KRAS(0.19±0.01)、PDGF-β(0.21±0.01)的蛋白水平明显降低($P<0.05$)。见图 7。

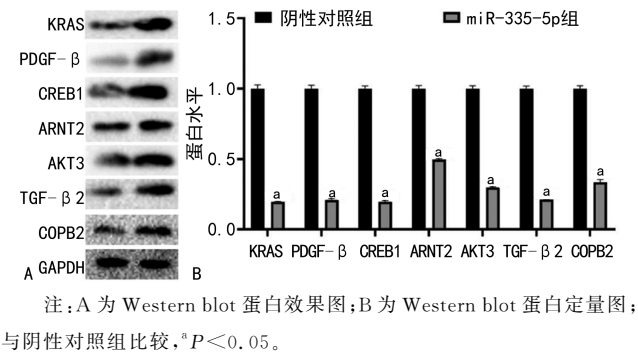


图 7 胃癌细胞中过表达 miR-335-5p 后筛选靶基因的蛋白表达情况

3 讨 论

胃癌是全球高发的恶性肿瘤之一,也是全球常见癌症相关死亡原因中排第 2 位的恶性肿瘤。目前胃癌治疗主要通过手术切除,但绝大多数胃癌在确诊时已属于进展期,已失去手术根治机会。因此,寻找早期诊断标志物是肿瘤研究的重大方向。目前,miRNA 已成为胃癌诊断中的重要标志物。为进一步研究其生物学表型和功能意义,本研究通过慢病毒 miR-335-5p 过表达载体感染胃癌细胞的方式在胃癌细胞中上调其表达,从而观察对胃癌细胞生物学增殖、侵袭方面的影响,并通过表达谱芯片与预测靶基因取交集的方式研究部分靶基因和富集的信号通路。

本研究结果表明,所筛选的靶基因所富集的信号通路如 TGF-β 信号通路、mTOR 信号通路、凋亡通路、p53 信号通路等均为调控肿瘤生物学表型的重要通路。相关研究发现,以上通路均是胃癌发生、发展密切相关的通路,这些通路的改变为深入探讨 miR-335-5p 的功能提供了依据。Western blot 验证结果表明,过表达 miR-335-5p 可以下调胃癌细胞中 CREB1、AKT3、COPB2、ARNT2、TGF-β2、KRAS、PDGF-β 的表达。

AKT3 是一种与细胞周期有关的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。AKT 激酶是响应胰岛素和生长因子的细胞信号的调节器,它们参与多种生物学过程,包括细胞增殖、分化、凋亡、肿瘤发生及糖原合成和葡萄糖摄取。该激酶已被证实可被 PDGF、胰岛素和胰岛素样生长因子 1(IGF1)刺激。HU 等^[4]研究表明,AKT3 在胃癌组织中高表达。LIU 等^[5]研究发现,原发性胃炎是癌症的一种独特表型,生存率低,3 个 PI3K/AKT 通路相关基因(PIK3R2、AKT3 和 IGF1)在原发性胃炎中表达上调。TAKAHASHI 等^[6]发现,

AKT3 表达是预测头颈部鳞状细胞癌免疫反应性和预后的潜在生物标志物。此外,AKT3 的异构体特异性抑制可作为一种新型的癌症治疗方法,有效抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路^[5-6]。

ARNT2 是碱性螺旋-环-螺旋-PAS 转录因子超家族的重要成员之一。编码的蛋白作为碱性螺旋-环-螺旋-PAS 家族的几个传感器蛋白的伴侣,与传感器蛋白形成异二聚体,该异二聚体结合响应发育和环境刺激的基因中的调节性 DNA 序列。在缺氧条件下,编码的蛋白与细胞核中的缺氧诱导因子-1α 组成复合物,该复合物与氧反应基因增强子和启动子中的缺氧反应元件结合。小鼠中高度相似的蛋白质与芳基羟受体和单一蛋白质形成功能复合物,表明编码的蛋白质在异源化合物的代谢和神经发生的调节中具有额外的作用。JIA 等^[7]研究发现,ARNT2 在胃癌组织中低表达,且与肿瘤的浸润深度、分化程度和较差的生存率呈负相关。过表达 ARNT2 可抑制细胞增殖。LI 等^[8]研究发现,ARNT2 在肝细胞癌中的表达明显高于癌旁组织,并与肿瘤的增殖、侵袭和转移密切相关。LI 等^[9]研究发现,ARNT2 是乳腺癌中与侵袭转移有关的 7 个核心基因之一。以上研究表明,ARNT2 在肿瘤的发生、发展中发挥了重要的作用,其在肿瘤中的表达具有组织特异性。

CREB1 编码一种转录因子,是 DNA 结合蛋白亮氨酸拉链家族的成员。该蛋白以同型二聚体的形式与 cAMP 反应元件(八聚体回文组)结合。该蛋白被多个蛋白激酶磷酸化,并诱导基因转录以响应对 cAMP 途径的激素刺激。CREB1 作为一种重要的原癌基因,作为蛋白激酶 A(PKA)的下游效应器,参与组成 cAMP/PKA/CREB 信号通路,可以调节癌症细胞的生长、迁移、侵袭和代谢^[10]。有研究表明,CREB 在许多生长信号通路下游的位置暗示了其在肿瘤细胞中的致癌潜力^[11]。肿瘤生长与 CREB 表达和活化增加有关,沉默 CREB1 可抑制肿瘤的生长^[12-13]。

TGF-β2 编码 TGF-β 蛋白超家族的分泌配体。该家族的配体结合各种 TGF-β 受体,导致调节基因表达的 SMAD 家族转录因子的募集和激活。编码的前蛋白被蛋白水解处理以产生潜伏相关肽(LAP)和成熟肽,并且以由成熟肽同二聚体、LAP 同二聚体和潜在 TGF-β 结合蛋白组成的潜伏形式存在,或者以仅由成熟肽同二聚体组成的活性形式存在。成熟肽也可以与其他 TGF-β 家族成员形成异二聚体。TGF-β/SMAD 途径的破坏与多种人类癌症有关。YANG 等^[14]研究表明,TGF-β2 在胃癌中高表达,并与肿瘤的组织学分级、淋巴结转移、免疫细胞浸润和预后不良相关。

KRAS 是哺乳动物 ras 基因家族的 Kirsten-ras 癌基因同源物,编码一种属于小 GTPase 超家族的蛋白质。一个单一的氨基酸取代是激活突变的原因。

转化蛋白与多种恶性肿瘤有关,包括肺腺癌、黏液腺癌、胰腺导管癌和结直肠癌。KRAS 被认为是人类癌症中最常见的突变致癌基因^[15]。研究证明,使用 KRAS 诱导系统可建立许多小鼠模型^[16]。YOON 等^[17]研究表明,17% 的胃腺癌发生 KRAS 的扩增和突变,敲低 KRAS 可抑制人胃腺癌细胞的上皮细胞-间充质转化和转移。

PDGF- β 是由 PDGF 和血管内皮生长因子组成的蛋白家族成员。编码的前蛋白被蛋白水解处理以产生血小板衍生生长因子亚单位 β ,其可与相关的血小板衍生生长因子亚单位 α 同聚或异聚。这些蛋白结合并激活 PDGF 受体酪氨酸激酶,在广泛的发育过程中发挥作用。该基因突变与脑膜瘤相关。22 号和 17 号染色体之间的相互易位,位于该基因和 I 型胶原 $\alpha 1$ 基因所在的位点,与皮肤纤维肉瘤(一种罕见的皮肤肿瘤)有关。有研究表明,PDGF- β 在胃癌组织中高表达,并与肿瘤浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期呈正相关,检测 PDGF- β 水平可作为判断胃癌转移和预后的指标之一^[18],PDGF/PDGFR 信号通路的激活通过调节多种下游通路,包括磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 通路和丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶通路,与癌症增殖、转移、侵袭和血管生成相关。因此,靶向 PDGF/PDGFR 信号通路已被证明是癌症治疗的有效策略^[19]。

COPB2 是典型的细胞质蛋白复合体的 1 个亚基,其与双赖氨酸基序结合,并与高尔基衍生的非网格蛋白包被的囊泡结合。在蛋白质生物合成过程中,COPB2 以囊泡的形式将其他蛋白质从内质网运送至高尔基体^[20]。COPB2 参与调节多种肿瘤的生物学行为,可在肺癌^[20]、乳腺癌^[21]等多种恶性肿瘤中异常表达。AN 等^[22]研究表明,COPB2 在胃癌中过表达,沉默 COPB2 可抑制细胞增殖,减少细胞集落的形成并诱导细胞凋亡。

本研究结果显示,miR-335-5p 上调表达抑制胃癌细胞增殖和侵袭能力,表达谱芯片筛选结合生物信息学靶基因预测分析取得交集,共获得 212 个 miR-335-5p 的靶基因,并富集在 20 个肿瘤相关的信号通路中。mRNA 和 Western blot 验证结果表明,靶基因 CREB1、AKT3、COPB2、ARNT2、TGF- $\beta 2$ 、KRAS、PDGF- β 是 miR-335-5p 调控胃癌发生、发展及预后的重要癌基因。检索文献和数据库均显示,CREB1、AKT3、COPB2、ARNT2、TGF- $\beta 2$ 、KRAS、PDGF- β 广泛参与胃癌细胞的增殖、侵袭、转移表型。本研究发现,miR-335-5p 上调表达可明显抑制胃癌细胞增殖和侵袭能力,所筛选的 212 个靶基因,包括 CREB1、AKT3、COPB2、ARNT2、TGF- $\beta 2$ 、KRAS、PDGF- β 均富集于 20 个与肿瘤相关的信号通路中,CREB1、AKT3、COPB2、ARNT2、TGF- $\beta 2$ 、KRAS、PDGF- β 是经生物信息学方法表达谱芯片筛选的交集基因,并经

PCR 实验和 Western blot 实验验证,由此说明 miR-335-5p 作为胃癌中的抑癌基因,其抑制胃癌细胞增殖和侵袭能力是由靶向调控 CREB1、AKT3、COPB2、ARNT2、TGF- $\beta 2$ 、KRAS、PDGF- β 所介导的。miR-335-5p 上调表达抑制胃癌细胞增殖和侵袭能力与抑制靶基因 CREB1、AKT3、COPB2、ARNT2、TGF- $\beta 2$ 、KRAS、PDGF- β 的表达有关。此外,表达谱芯片结合生物信息学手段是重要的组学筛选的方法,本研究中所发现的差异表达基因所富集的信号通路和筛选的核心基因均能说明 miR-335-5p 在胃癌中是影响表型的关键分子,是调控胃癌生物学表型的观察窗口。另外,通过表达谱芯片结合生物信息学分析发现的具有高度相关性的癌基因和信号通路为探讨 miR-335-5p 调控胃癌的机制提供了线索和依据。

参考文献

- [1] GAO Y, WANG Y F, WANG X F, et al. miR-335-5p suppresses gastric cancer progression by targeting MAPK10 [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 71.
- [2] SANDOVAL-BÓRQUEZ A, POLAKOVICOVA I, CAR RASCO-VÉLIZ N, et al. MicroRNA-335-5p is a potential suppressor of metastasis and invasion in gastric cancer [J]. *Clin Epigenetics*, 2017, 9: 114.
- [3] 王峥嵘, 王玲燕, 董琴晖. 微小 RNA-335, 癌胚抗原相关细胞黏附分子 5 在胃癌组织中的表达及与预后的关系 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2021, 31(21): 2626-2631.
- [4] HU J D, NI G H, MAO L, et al. LINC00565 promotes proliferation and inhibits apoptosis of gastric cancer by targeting miR-665/AKT3 axis [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 7865-7875.
- [5] LIU Z, HONG L L, ZHENG J S, et al. Comprehensive transcriptomic profiling and mutational landscape of primary gastric linitis plastica [J]. *Gastric Cancer*, 2023, 26(2): 203-219.
- [6] TAKAHASHI H, ROKUDAI S, KAWABATA-IWAKAWA R, et al. AKT3 is a key regulator of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(6): 2325.
- [7] JIA Y F, HAO S H, JIN G C, et al. Overexpression of ARNT2 is associated with decreased cell proliferation and better prognosis in gastric cancer [J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 450(1/2): 97-103.
- [8] LI W W, LIANG Y, YANG B W, et al. Downregulation of ARNT2 promotes tumor growth and predicts poor prognosis in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2015, 30(6): 1085-1093.
- [9] LI W, LIU J L, ZHANG B, et al. Transcriptome analysis reveals key genes and pathways associated with metastasis in breast cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 323-335.
- [10] ZHANG H Y, KONG Q B, WANG J, et al. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2020, 9(1): 32. (下转第 2885 页)

- to miR-455-3p[J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(4): 1019-1030.
 - [6] WEN Y, ZHANG X, LIU X, et al. Suppression of lncRNA SNHG15 protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by targeting miR-183-5p/FOXO1 axis[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(10): 6250-6263.
 - [7] WAN H, YOU T, LUO W. circ_0003204 regulates cell growth, oxidative stress, and inflammation in ox-LDL-induced vascular endothelial cells via regulating miR-942-5p/HDAC9 axis[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 646832.
 - [8] 李梦婷, 曾朝阳, 黄文蓉, 等. 阿尔兹海默症的发病机制研究进展[J/CD]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2020, 20(76): 39-41.
 - [9] 刘军. 氧化应激在阿尔茨海默病病理发生中的作用机制与干预策略[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2020, 41(5): 661-668.
 - [10] 张赫, 郑焱. β 淀粉样蛋白级联假说相关的阿尔茨海默病发病机制及防治策略研究进展[J]. 中国医学科学院学报, 2019, 41(5): 702-708.
 - [11] WANG H R, PEI S Y, FAN D X, et al. Luteolin protects pheochromocytoma (PC-12) cells against $A\beta_{25-35}$ -induced cell apoptosis through the ER/ERK/MAPK signalling pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 2861978-2861986.
 - [12] 符绩军, 张金臣. 阿尔茨海默病患者认知功能变化与氧化应激指标、总雌二醇及生物可利用雌二醇变化的关系[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(10): 535-537.
 - [13] IDDA M L, MUNK R, ABDELMOHSEN K, et al. Non-coding RNAs in Alzheimer's disease[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018, 9(2): 10.
 - [14] GUAN F L, GAO Q C, DAI X H, et al. LncRNA RP11-59J16.2 aggravates apoptosis and increases tau phosphorylation by targeting MCM2 in AD[J]. *Front Genet*, 2022, 13: 824495.
 - [15] CHEN D P, ZHANG Z J, LU X R, et al. Long non-coding RNA SNHG15 regulates cardiomyocyte apoptosis after hypoxia/reperfusion injury via modulating miR-188-5p/PTEN axis[J]. *Arch Physiol Biochem*, 2023, 129(2): 283-290.
 - [16] HU C, LI C, MA Q, et al. Inhibition of long noncoding RNA SNHG15 ameliorates hypoxia/ischemia-induced neuronal damage by regulating miR-302a-3p/STAT1/NF- κ B axis[J]. *Yonsei Med J*, 2021, 62(4): 325-337.
 - [17] ZHANG J J, WANG R. Deregulated lncRNA MAGI2-AS3 in Alzheimer's disease attenuates amyloid- β induced neurotoxicity and neuroinflammation by sponging miR-374b-5p[J]. *Exp Gerontol*, 2021, 144: 111180-111205.
 - [18] LUO N, GAO H M, WANG Y Q, et al. MiR-942-5p alleviates septic acute kidney injury by targeting FOXO3[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(11): 6237-6244.
 - [19] WANG H, LIN X, LI J, et al. Long noncoding RNA SOX2-OT aggravates doxorubicin-induced apoptosis of cardiomyocyte by targeting miR-942-5p/DP5[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 481-492.
- (收稿日期: 2023-04-03 修回日期: 2023-10-14)
-
- (上接第 2879 页)
- [11] AHMED M B, ALGHAMDI A, ISLAM S U, et al. cAMP signaling in cancer: a PKA-CREB and EPAC-centric approach[J]. *Cells*, 2022, 11(13): 2020.
 - [12] RAO M, ZHU Y, CONG X, et al. Knockdown of CREB1 inhibits tumor growth of human gastric cancer in vitro and in vivo[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(6): 3361-3368.
 - [13] ZHAO Y J, ZHANG J, WANG Y C, et al. MiR-450a-5p inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion and promotes apoptosis via targeting CREB1 and inhibiting AKT/GSK-3 β signaling pathway[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 633366.
 - [14] YANG B W, BAI J, SHI R C, et al. TGF- β 2 serves as a link between epithelial-mesenchymal transition and tumor mutation burden in gastric cancer[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84: 106532.
 - [15] TIMAR J, KASHOFER K. Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2020, 39(4): 1029-1038.
 - [16] WON Y, CHOI E. Mouse models of Kras activation in gastric cancer[J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(11): 1793-1798.
 - [17] YOON C, TILL J, CHO S J, et al. KRAS activation in gastric adenocarcinoma stimulates epithelial-to-mesenchymal transition to cancer stem-like cells and promotes metastasis[J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(9): 1945-1957.
 - [18] ZHAO X, YU Z H, ZANG K. Platelet-derived growth factors affect clinical features and prognosis of gastric cancer[J]. *J Oncol*, 2022, 2022: 2108368.
 - [19] XIANG Z, TANG X Y, QU Z Y, et al. Targeting the PDGF/PDGFR signaling pathway for cancer therapy: a review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 202: 539-557.
 - [20] PU X L, JIANG H, LI W, et al. Upregulation of the coatamer protein complex subunit beta 2 (COPB2) gene targets microRNA-335-3p in NCI-H1975 lung adenocarcinoma cells to promote cell proliferation and migration[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e918382.
 - [21] BHANDARI A, ZHENG C, SINDAN N, et al. COPB2 is up-regulated in breast cancer and plays a vital role in the metastasis via N-cadherin and Vimentin[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8): 5235-5245.
 - [22] AN C, LI H, ZHANG X, et al. Silencing of COPB2 inhibits the proliferation of gastric cancer cells and induces apoptosis via suppression of the RTK signaling pathway[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(4): 1195-1208.
- (收稿日期: 2023-02-18 修回日期: 2023-10-15)