

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.01.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.01.001>

· 论著 ·

MiR-520a 对胃癌 SGC7901 细胞增殖、侵袭、迁移以及顺铂药物敏感性的影响

吴越菲¹, 徐礼鹏¹, 孙燃², 韦永明¹

(芜湖市第二人民医院 1. 介入科; 2. 病理科, 安徽 芜湖 241000)

[摘要] 目的: 探讨miR-520a在胃癌中的表达以及对胃癌细胞生物学功能的影响。方法: 通过real-time PCR检测miR-520a在胃癌组织和胃癌细胞中的表达。采用慢病毒在胃癌细胞SGC7901中过表达miR-520a, 在体外观察miR-520a对胃癌细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移以及对顺铂(DDP)敏感性的影响。并通过异种移植瘤实验观察过表达miR-520a对胃癌细胞在裸鼠体内生长的影响。结果: 与癌旁正常组织相比, miR-520a在胃癌组织中的表达明显降低。与正常胃黏膜上皮细胞GES-1相比, miR-520a在胃癌SGC7901细胞中的表达明显降低, 且在顺铂耐药SGC7901/DDP细胞中的表达更低。miR-520a过表达能够促进SGC7901细胞凋亡, 抑制细胞增殖、侵袭和迁移。miR-520a过表达促进SGC7901细胞对DDP的药物敏感性增加。异种移植瘤实验发现miR-520a过表达的细胞在裸鼠体内形成的肿瘤生长速度减慢。结论: miR-520a可抑制胃癌发生与发展, 提高胃癌细胞对顺铂的敏感性。

[关键词] 胃癌; miR-520a; 抑癌基因; 顺铂敏感性

Effect of miR-520a on proliferation, invasion, migration and cisplatin sensitivity in gastric cancer SGC7901 cells

WU Yuefei¹, XU Lipeng¹, SUN Ran², WEI Yongming¹

(1. Department of Invasive Technology; 2. Department of Pathology, Second People's Hospital of Wuhu, Wuhu Anhui 241000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of miR-520a in gastric cancer and its effect on the biological function in gastric cancer cells. **Methods:** The expression of miR-520a in gastric tissues and gastric cells was detected by real-time PCR. Lentivirus was used to over-express miR-520a in gastric cancer SGC7901 cells, and the effect of miR-520a on proliferation, apoptosis, invasion and migration of gastric cancer cells and the sensitivity to cisplatin (DDP) was evaluated in vitro. In addition, the effect of miR-520a over-expression on the growth of xenograft tumor was observed in vivo. **Results:** The expression of miR-520a in gastric cancer tissues was significantly lower than that in the adjacent normal tissues. Compared with normal gastric mucosal epithelial GES-1 cells, the expression of miR-520a was significantly decreased in gastric cancer SGC7901 cells and even lower in cisplatin resistant SGC7901/DDP cells. MiR-520a over-expression promoted apoptosis and inhibited cell proliferation, invasion and migration in SGC7901 cells. MiR-520a over-expression promoted the drug sensitivity of SGC7901 cells to DDP. Xenograft

收稿日期 (Date of reception): 2019-04-15

通信作者 (Corresponding author): 韦永明, Email: 1721385835@qq.com

tumor experiment data showed that the miR-520a over-expression slowed down the tumor growth in nude mice.

Conclusion: MiR-520a can inhibit the occurrence and development of gastric cancer and enhance the sensitivity of gastric cancer cells to cisplatin.

Keywords gastric cancer; miR-520a; tumor suppressor; cisplatin sensitivity

胃癌发病率高, 世界范围在肿瘤发病率中排第4位, 而在中国发病率居所有癌症的第1位, 而其病死率在所有恶性肿瘤中排名第3位, 严重威胁到人类健康^[1-2]。胃癌细胞生长较快, 且易发生转移。因此寻找有效的阻断胃癌细胞的恶性增殖和转移的分子靶点, 对胃癌治疗具有重要意义。微小RNA(miRNA)是由20~22个核苷酸构成的小的非编码RNA, 在多种癌症中发挥重要作用^[3-4]。异常表达的miRNA与胃癌疾病相关, 它参与了多种生物学功能, 如增殖、侵袭、迁移、凋亡及耐药等^[5-7]。MiR-520a在肝癌中通过靶向E2F转录因子(E2F transcription factor 2, E2F2)抑制癌细胞的增殖、侵袭和迁移^[8], 通过调控表皮生长因子(epidermal growth factor receptor, ErbB4)抑制食管鳞癌的增殖与侵袭^[9], 并且在乳腺癌^[10]、伯基特淋巴瘤^[11]等多种肿瘤中发挥重要的抑癌作用。然而miR-520a在胃癌中的功能研究尚少。因此, 本研究观察miR-520a在胃癌组织的表达及过表达miR-520a对胃癌细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移以及对顺铂敏感性的改变。

1 材料与方法

1 材料

胃腺癌细胞SGC7901、正常人胃黏膜上皮细胞GES-1和顺铂耐药细胞SGC7901/DDP均购自于上海雅吉生物科技有限公司。LV-miR-520a和LV-NC由上海吉玛基因股份公司构建。胎牛血清、RPMI-1640培养基、胰蛋白酶购自于美国Gibco公司; CCK-8试剂盒、Annexin-FITC/PI染色试剂盒均购自于南京凯基生物公司; 免疫荧光及免疫组织化学用抗Ki-67抗体购自于美国Proteintech公司; miRNA提取、反转录试剂盒和real-time PCR检测试剂盒均购自于美国Ambion公司; 免疫组织化学二步法检测试剂盒和DAB显色液均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。新鲜胃癌及癌旁正常组织来自于手术切除标本, 并经病理检查确诊为胃腺癌。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

GES-1细胞、SGC7901细胞及其DDP耐药株

SGC7901/DDP生长于含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中。当细胞处于对数生长期时, 根据后续实验要求, 收集细胞接种于不同规格的细胞培养器皿中。

1.2.2 临床样本获取

收集20例T分期II期胃癌患者癌组织和癌旁组织(距浸润边缘2.5 cm)。所有样本采集自在芜湖市第二人民医院进行胃癌部分切除患者。所有患者知情同意, 本研究通过芜湖市第二人民医院医学伦理委员会批准。

1.2.3 Real-time PCR 检测 miR-520a 的表达

用miRNA分离试剂盒从新鲜胃癌及配对癌旁组织、SGC7901细胞和SGC7901/DDP细胞中提取总RNA, 然后通过反转录试剂盒反转录为cDNA。各样本cDNA采用real-time PCR检测试剂盒进行实时定量PCR反应, U6做为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算miR-520a的相对表达。

1.2.4 LV-miR-520a 细胞感染

SGC7901细胞接种于6孔板中, 培养至细胞达到80%融合时, 分别更换含有30感染复数(multiplicity of infection, MOI)的LV-miR-520a和LV-NC细胞培养基继续培养48 h。real-time PCR检测miR-520a的表达。

1.2.5 胃癌细胞对 DDP 药物敏感性检测

分别取稳定感染LV-miR-520a和LV-NC细胞, 按照5 000个/孔的密度接种于96孔板培养板中, 等细胞完全贴壁后, 按浓度梯度0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DDP加入细胞, 继续培养24 h后, 换新鲜培养基, 同时加入10%的CCK-8试剂, 继续培养2 h后在450 nm处测定各孔吸光度。

1.2.6 Annexin-FITC/PI 双染检测细胞凋亡

分别取稳定感染LV-miR-520a和LV-NC细胞按照 5×10^5 个/孔的密度接种于6孔板, 等细胞完全贴壁后, 继续培养24 h, 以胰蛋白酶消化后收集细胞, 然后利用PBS缓冲液重悬获取单细胞悬液。调整细胞密度至 10^5 个/mL, 根据说明书利用Annexin V-FITC/PI染色试剂避光染色30 min后, 立即用流式细胞术检测细胞凋亡状况并进行分析。

1.2.7 细胞免疫荧光

分别取稳定感染LV-miR-520a和LV-NC细胞按照 5×10^5 个/孔的密度铺于共聚焦小皿中。等细胞完全贴壁后, 继续培养24 h, 弃旧培养基, 用PBS轻

洗3次, 4%多聚甲醛固定30 min, 用0.5%Triton穿孔破膜10 min, 1%BSA室温封闭30 min, 加入Ki-67一抗, 4℃孵育过夜, PBS漂洗3次, 加入荧光二抗室温避光孵育2 h, PBS漂洗3次, 用DAPI(1:1 000稀释)染核5 min, PBS漂洗3次, 激光共聚焦显微镜下观察共定位情况并拍照。

1.2.8 Transwell 实验检测细胞侵袭

首先将基质胶与RPMI 1640培养基按1:30稀释, 将100 μ L稀释液均匀铺到Transwell小室内底部, 放置37℃环境中1 h。分别用300 μ L不含血清的培养基稀释 5×10^3 个已稳定感染LV-miR-520a和LV-NC细胞接种至上室, 在下室中加入600 μ L含20%胎牛血清的RPMI 1640细胞培养基。37℃, 5%CO₂条件下培养24 h后, 取出培养的小室, 小心吸弃小室内培养基, 用甲醇固定20 min, 用去离子水清洗小室, 凉干后吉姆萨染色15 min, 用湿棉签擦去上室底部未穿出的细胞, 将小室倒置, 在光学显微镜下观察、拍照, 每组细胞随机选取5个200倍视野计数并算出每个视野的细胞平均数。

1.2.9 划痕愈合实验检测细胞迁移

分别取稳定感染LV-miR-520a和LV-NC细胞按照 5×10^5 个/孔的密度接种于6孔板, 等细胞生长至完全融合时, 用10 μ L无菌的枪头在单层细胞划痕, 然后PBS漂洗细胞2次; 在培养基进行细胞培养24 h, 置于倒置显微镜下观察。拍照记录划痕宽度变化情况。

1.2.10 裸鼠皮下成瘤实验

6周龄雄性BALB/c裸鼠购自广东省医学实验动物中心, 饲养于动物房。将稳定感染LV-miR-520a和LV-NC细胞用无血清培养基制备成单细胞悬液。选取裸鼠8只, 分为LV-miR-520a组和LV-NC组, 每

组4只。LV-miR-520a组在右侧臀上部注射稳定感染LV-miR-520a细胞; LV-NC组在右侧臀上部注射稳定感染LV-NC细胞; 每只裸鼠接种细胞数为 5×10^6 个, 细胞悬液容积为100 μ L。等有明确的肿瘤形成后开始, 观测至第42天, 麻醉后处死荷瘤小鼠, 取皮下瘤, 称重并拍照。

1.2.11 免疫组织化学检测

将裸鼠皮下瘤组织石蜡包埋, 切4 μ m切片, 脱蜡后用枸橼酸盐溶液在高压锅中修复5 min, 滴加一抗Ki-67和TUNEL, 4℃过夜后滴加二抗, DAB显色后用苏木精复染细胞核, 封片并显微镜观察。

1.3 统计学处理

采用SPSS 15.0统计软件进行数据分析。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组数据比较采用非配对t检验, 多组数据比较采用单因素方差分析后LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-520a 在胃癌中的表达下调, 在胃癌 DDP 耐药株中的表达较母细胞株降低

real-time PCR检测20对胃腺癌和配对癌旁组织中miR-520a的表达, 结果发现: 与癌旁组织比较, miR-520a在胃癌组织中的表达明显下降, 差异具有统计学意义($P < 0.01$, 图1A)。与正常胃黏膜上皮细胞GES-1相比, miR-520a在胃癌细胞株SGC7901中的表达显著下降, 差异具有统计学意义($P < 0.001$); 且miR-520a在SGC7901/DDP细胞株中的表达较SGC7901细胞株显著下调, 差异具有统计学意义($P < 0.001$, 图1B)。

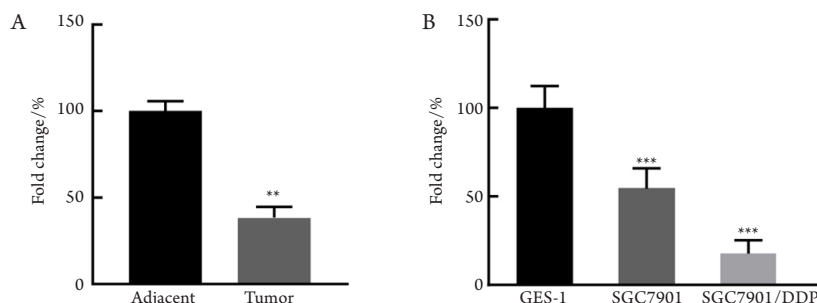


图1 miR-520a在胃癌组织和胃癌细胞SGC7901中的表达

Figure 1 miR-520a expression in gastric cancer tissues and gastric cancer SGC7901 cells

(A) miR-520a在胃癌组织中表达低于癌旁组织($n=20$)。与癌旁组织比较, $**P < 0.01$ 。(B) miR-520a在胃癌SGC7901细胞中表达水平低于正常胃黏膜上皮GES-1细胞($n=4$)。与GES-1比较, $***P < 0.001$ 。

(A) Expression of miR-520a is lower in gastric cancer tissues than adjacent tissues ($n=20$). $**P < 0.01$ vs adjacent tissues. (B) Expression of miR-520a is lower in gastric cancer SGC7901 cells than gastric epithelial GES-1 cells, and lowest in DDP resistant SGD7901/DDP cells ($n=4$). $***P < 0.001$ vs GES-1 cells.

2.2 过表达 miR-520a 促进 SGC7901 细胞对 DDP 的敏感性和细胞凋亡, 抑制增殖

用过表达 miR-520a 的慢病毒载体 (LV-miR-520a) 和对照慢病毒载体 (LV-NC) 感染 SGC7901 细胞后, 发现与 LV-NC 组相比, 感染 LV-miR-520a 的细胞中 miR-520a 表达明显升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 而感染 LV-NC 的细胞中 miR-520a 表达与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2A)。接着采用 CCK-8 分析过表达 miR-520a 的 SGC7901

细胞对 DDP 药物敏感性的影响, 实验结果显示: 与 LV-NC 组相比, LV-miR-520a 组细胞活性显著降低 ($P < 0.001$, 图 2B)。使用 Annexin V-FITC/PI 双染法对细胞凋亡状况进行流式细胞术分析, 发现与 LV-NC 组相比, LV-miR-520a 组细胞凋亡明显增加 ($P < 0.01$; 图 2C, 2D)。通过免疫荧光检测增殖指数 Ki-67 的表达, 发现与 LV-NC 组相比, LV-miR-520a 组 Ki-67 阳性细胞明显降低 ($P < 0.01$; 图 2E, 2F)。

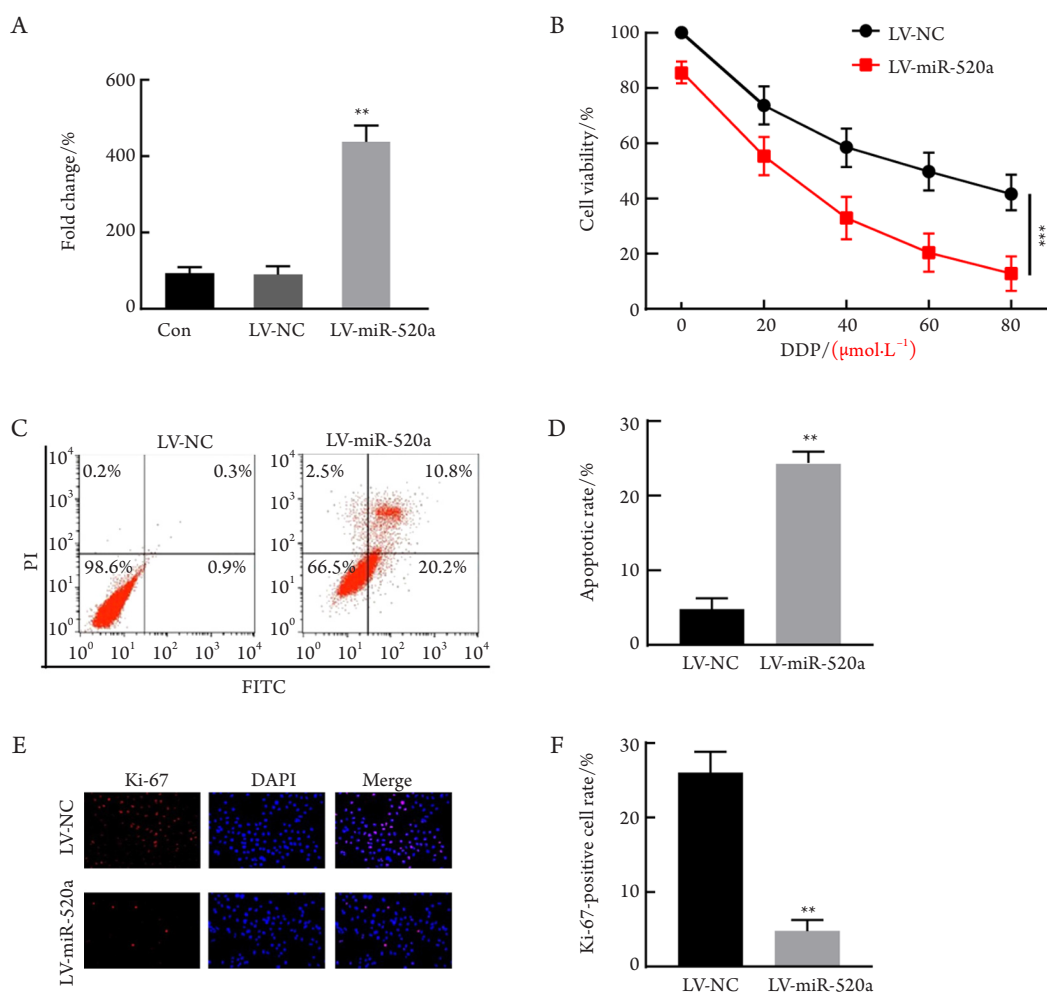


图2 miR-520a 对SGC7901细胞功能的影响

Figure 2 The function of miR-520a in SGC7901 cells

(A) real-time PCR确定LV-miR-520a在SGC7901中转染效率结果; (B) miR-520a可提高SGC7901细胞对DDP敏感性; (C, D) miR-520a可增加SGC7901细胞凋亡; (E, F) miR-520a过度表达后Ki-67指数降低 ($\times 100$, $n=4$)。与LV-NC组比较, ** $P < 0.01$ 。

(A) Transfection efficiency of LV-miR-520a in SGC7901 was confirmed by real-time PCR; (B) miR-520a increased the sensitivity of SGC7901 cells to DDP; (C, D) miR-520a over-expression increased apoptosis in SGC7901 cells; (E, F) Ki-67 index was decreased after miR-520a over-expression ($\times 100$, $n=4$). ** $P < 0.01$ vs LV-NC group.

2.3 miR-520a 在体外抑制胃癌细胞侵袭和迁移

通过Transwell实验和划痕愈合实验观察过表达miR-520a对SGC7901细胞侵袭和迁移的影响,发现与LV-NC组相比,过表达miR-520a抑制SGC7901细胞侵袭和迁移,差异均有统计学意义($P<0.01$,图3)。

2.4 miR-520a 抑制胃癌细胞在裸鼠体内的生长

裸鼠皮下成瘤实验结果显示:与LV-NC组相

比, LV-miR-520a组小鼠成瘤的重量较轻,差异有统计学意义($P<0.01$,图4A)。对皮下成瘤组织进行Ki-67免疫组织化学检测发现:与LV-NC组相比, LV-miR-520a组小鼠Ki-67阳性细胞数较少,差异有统计学意义($P<0.01$;图4B, 4C)。对皮下成瘤组织进行TUNEL免疫组织化学检测显示:与LV-NC组相比, LV-miR-520a组小鼠TUNEL阳性细胞数较多,差异有统计学意义($P<0.01$;图4D, 4E)。

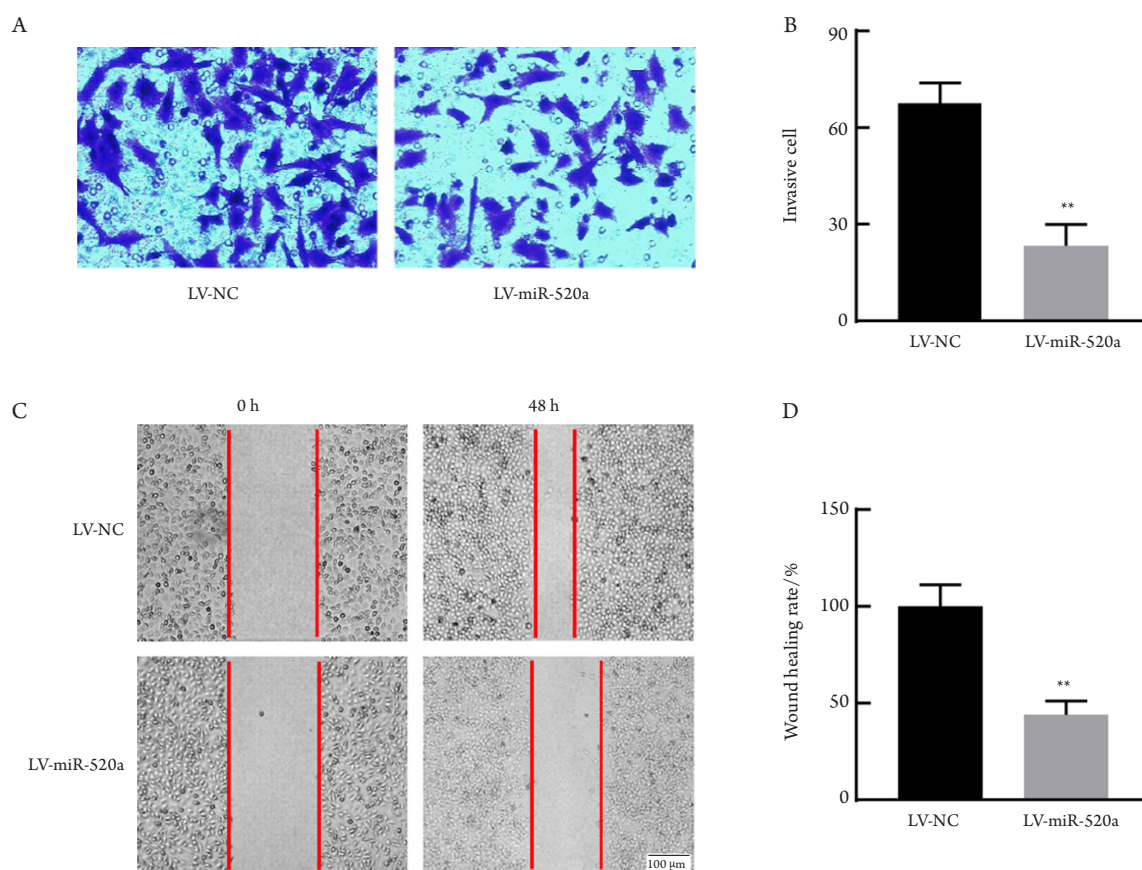


图3 miR-520a过表达抑制SGC7901细胞的侵袭和迁移

Figure 3 miR-520a over-expression inhibits the invasion and migration in SGC7901 cells

(A, B) Transwell检测细胞侵袭($\times 200$); (C, D) 细胞划痕检测细胞迁移(比例尺100 μm , $n=4$)。与LV-NC组比较, $**P<0.01$ 。

(A, B) Cell invasion was detected by transwell assay ($\times 200$); (C, D) Cell migration was detected by wound healing assay (scale bar: 100 μm , $n=4$). $**P<0.01$ vs LV-NC group.

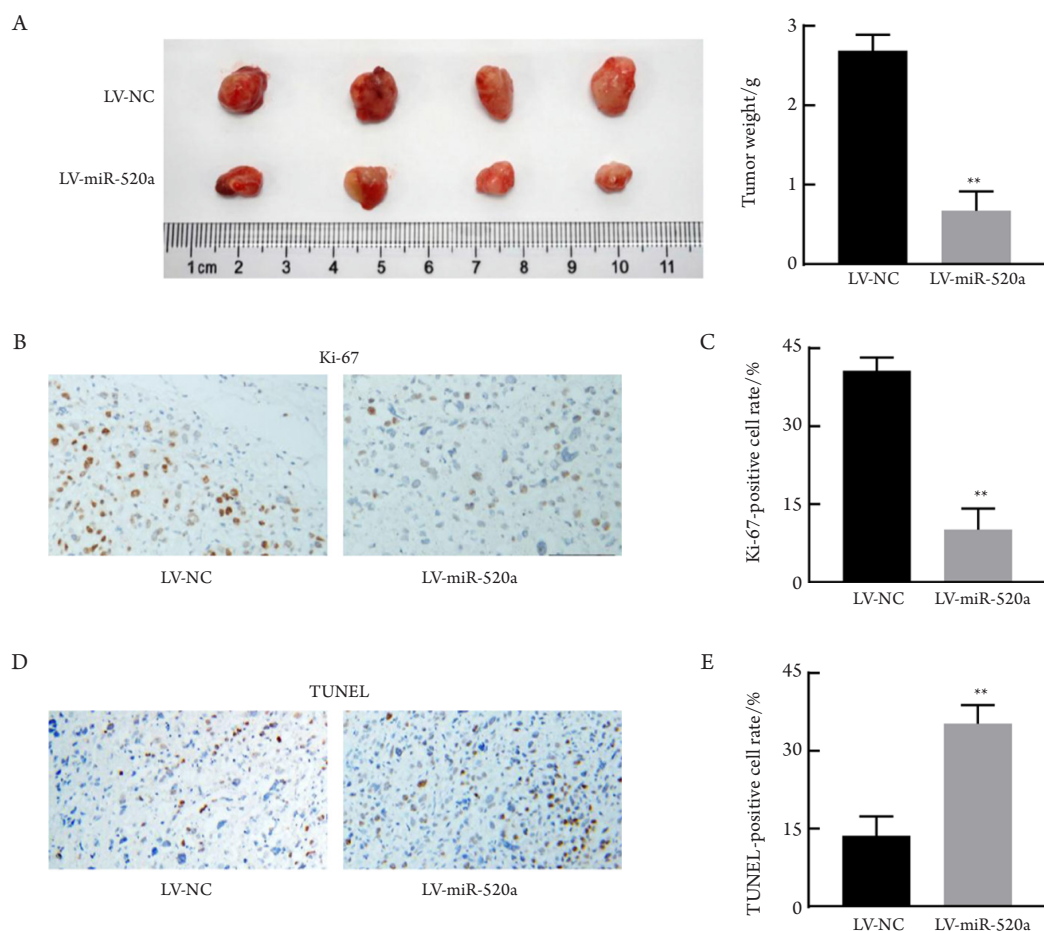


图4 miR-520a过表达在体内抑制肿瘤生长

Figure 4 miR-520a over-expression inhibits tumor growth in vivo

(A) miR-520a过表达细胞形成的皮下肿瘤明显轻于LV-NC组; (B, C) miR-520a过表达后Ki-67指数降低($\times 100$)。 (D, E) miR-520a过表达后TUNEL指数升高($\times 100$, $n=4$)。与LV-NC组比较, $**P<0.01$ 。

(A) Subcutaneous tumors formed by miR-520a over-expression cells are lighter than LV-NC group; (B, C) miR-520a over-expression tumor cells exhibits lower Ki-67 index ($\times 100$). (D, E) miR-520a over-expression tumor cells exhibits higher TUNEL index ($\times 100$, $n=4$).

$**P<0.01$ vs LV-NC group.

3 讨论

众多研究^[3-4]发现miRNA表达失常与众多肿瘤发病进展相关。且有研究^[8-11]发现miR-520a在肝癌、食管鳞癌、乳腺癌和伯基特淋巴瘤细胞中表达降低, 而过表达miR-520a能抑制肝癌、食管鳞癌、乳腺癌和伯基特淋巴瘤细胞恶性生物学行为, 但其在胃癌中的作用尚不清楚。本研究结果显示: miR-520a在胃癌组织和胃癌SGC7901细胞中表达也降低, 提示miR-520a可能也是胃癌的抑制剂。进一步通过慢病毒感染胃癌SGC7901细胞构建miR-520a过表达的SGC7901细胞功能实验发现: 过表达miR-520a能抑制胃癌细胞增殖、侵袭和迁

移, 并促进细胞凋亡。同时, 过表达miR-520a的SGC7901细胞在裸鼠皮下形成的异种移植瘤中生长速度较慢。这些结果确认了miR-520a是胃癌的抑制剂。

大部分胃癌患者临床采用肿瘤切除术后辅以铂类药物为主的化学药物治疗(简称化疗)作为胃癌的治疗方法^[12]。但部分胃癌患者在化疗一段时间后会产化疗耐药^[13], 若加大化疗剂量会增大化疗不良反应。因此, 增加顺铂化疗敏感性, 对患者治疗效果、预后和减少化疗不良反应具有重大意义。在胃癌的研究中, 许多影响胃癌细胞化疗敏感性的基因受到miRNA的调控^[14-15]。如miR-218通过survivin增强胃癌细胞顺铂敏感性^[14], miR-

200c通过锌指结构蛋白2(zinc-finger E-box-binding homeobox2, ZEB2)抑制胃癌细胞顺铂耐药性^[15]等。本研究发现: miR-520a在GC7901/DDP细胞中低表达, 过表达miR-520a能导致SGC7901细胞对DDP的敏感性增强, 提示miR-520a是胃癌细胞顺铂化疗中的增敏剂, 但具体机制有待进一步研究。

综上, miR-520a在胃癌组织及胃癌细胞中表达明显降低, miR-520a过表达可抑制胃癌细胞发生与发展, 并且能提高胃癌细胞对顺铂的敏感性。

参考文献

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
2. 左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国胃癌流行病学现状[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(1): 52-58.
ZUO Tingting, ZHENG Rongshou, ZENG Hongmei, et al. Epidemiology of stomach cancer in China[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2017, 44(1): 52-58.
3. Tutar L, Özgür A, Tutar Y. Involvement of miRNAs and pseudogenes in cancer[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1699: 45-66.
4. Ganju A, Khan S, Hafeez BB, et al. miRNA nanotherapeutics for cancer[J]. Drug Discov Today, 2017, 22(2): 424-432.
5. Shin VY, Chu KM. MiRNA as potential biomarkers and therapeutic targets for gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(30): 10432-10439.
6. Yang W, Ma J, Zhou W, et al. Molecular mechanisms and theranostic potential of miRNAs in drug resistance of gastric cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2017, 21(11): 1063-1075.
7. Wang L, Wang X, Jiang X. miR-127 suppresses gastric cancer cell migration and invasion via targeting Wnt7a[J]. Oncol Lett, 2019, 17(3): 3219-3226.
7. Dong Y, Zou J, Su S, et al. MicroRNA-218 and microRNA-520a inhibit cell proliferation by downregulating E2F2 in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(1): 1016-1022.
8. 叶文广, 姚青林, 张明鑫, 等. miR-520a调控ErbB4的表达并抑制食管鳞癌细胞的增殖与侵袭[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(2): 164-168.
YE Wenguang, YAO Qinglin, ZHANG Mingxin, et al. miR-520a regulates ErbB4 expression and suppresses proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Journal of Southern Medical University, 2014, 34(2): 164-168.
9. Li J, Wei J, Mei Z, et al. Suppressing role of miR-520a-3p in breast cancer through CCND1 and CD44[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(1): 146-154.
10. Wang X, Wang P, Zhu Y, et al. MicroRNA-520a attenuates proliferation of Raji cells through inhibition of AKT1/NF-κB and PERK/eIF2α signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2016, 36(3): 1702-1708.
11. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, et al. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014, 23(5): 700-713.
12. Orditura M, Galizia G, Sforza V, et al. Treatment of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(7): 1635-1649.
13. Marin JJ, Al-Abdulla R, Lozano E, et al. Mechanisms of resistance to chemotherapy in gastric cancer[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2016, 16(3): 318-334.
14. Zhang Z, Kong Y, Yang W, et al. MicroRNA-218 enhances gastric cancer cell cisplatin sensitivity by targeting survivin[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(6): 4796-4802.
15. Jiang T, Dong P, Li L, et al. MicroRNA-200c regulates cisplatin resistance by targeting ZEB2 in human gastric cancer cells[J]. Oncol Rep, 2017, 38(1): 151-158.

本文引用: 吴越菲, 徐礼鹏, 孙燃, 韦永明. MiR-520a对胃癌SGC7901细胞增殖、侵袭、迁移以及顺铂药物敏感性的影响[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(1): 1-7. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.01.001

Cite this article as: WU Yuefei, XU Lipeng, SUN Ran, WEI Yongming. Effect of miR-520a on proliferation, invasion, migration and cisplatin sensitivity in gastric cancer SGC7901 cells[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(1): 1-7. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.01.001