

研究论文

miR-181b-5p对胃癌细胞HGC-27增殖和凋亡的影响

张笑添^{1*} 常新剑^{2#} 宋林林^{3#}¹山西医科大学汾阳学院医学检验系, 汾阳 032200; ²山西省汾阳医院分子遗传实验室, 汾阳 032200;³山西省汾阳医院检验科, 汾阳 032200)

摘要 该文检测了人胃癌血清和胃癌细胞HGC-27中miR-181b-5p的水平, 并研究了miR-181b-5p对胃癌细胞HGC-27增殖和凋亡能力的影响, 以探讨miR-181b-5p在胃癌发生和发展中可能的作用。荧光定量PCR(Real-time quantitative PCR, qRT-PCR)检测胃癌患者和健康人群血清中miR-181b-5p的水平以及胃癌细胞HGC-27和胃黏膜细胞GES-1中miR-181b-5p的水平, 采用脂质体瞬时转染技术将miR-181b-5p抑制剂(inhibitors)以及inhibitors阴性对照分别转入胃癌细胞HGC-27中, 用qRT-PCR验证转染后miR-181b-5p的水平, CCK-8法检测miR-181b-5p对胃癌细胞HGC-27的增殖能力的影响, 流式细胞术检测转染后胃癌细胞HGC-27细胞周期和凋亡的变化。qRT-PCR结果显示, 胃癌患者血清中miR-181b-5p的水平高于健康人群($P<0.05$); 胃癌细胞HGC-27中miR-181b-5p的水平显著高于胃黏膜细胞GES-1中的水平($P<0.01$); 转染miR-181b-5p inhibitors后其miR-181b-5p的水平显著低于inhibitors阴性对照组($P<0.01$)。CCK-8结果显示, 将miR-181b-5p的水平下调后, 胃癌细胞HGC-27的增殖能力明显下降($P<0.01$)。流式细胞术检测结果显示, 转染miR-181b-5p inhibitors后, 胃癌细胞HGC-27的凋亡率显著增高($P<0.01$)。细胞周期检测结果显示, 转染miR-181b-5p inhibitors后, 其S期明显缩短, G₂/M期延长, 细胞增殖受到抑制。以上结果表明, 血清miR-181b-5p可能作为胃癌早期诊断的一个分子肿瘤标志物; miR-181b-5p在胃癌的发生和发展过程中可能起到癌基因的作用, 并有可能作为胃癌分子治疗的一个新靶点。

关键词 miR-181b-5p; 胃癌; 细胞周期; 增殖; 凋亡

The Effect of miRNA-181b-5p on Proliferation and Apoptosis of Human Gastric Cancer Cell HGC-27

Zhang Xiaotian^{1*}, Chang Xinjian^{2#}, Song Linlin^{3#}¹Department of Medical Laboratory Science, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China;²Laboratory of Molecular Genetics, Fenyang Hospital of Shanxi Province, Fenyang 032200, China;³Department of Clinical Laboratory, Fenyang Hospital of Shanxi Province, Fenyang 032200, China)

Abstract The miRNA-181b-5p levels in serum of gastric cancer patients and gastric cancer cell HGC-27 were detected, and the effect of miRNA-181b-5p on proliferation and apoptosis of gastric cancer cell HGC-27 were investigated, which in order to explore the role of miRNA-181b-5p in the progress and development of gastric cancer. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was performed to detect miRNA-181b-5p levels in serum of gastric cancer

收稿日期: 2016-09-10 接受日期: 2016-12-13

山西医科大学汾阳学院科研项目启动基金(批准号: 1312)资助的课题

#共同第二作者

*通讯作者。Tel: 0358-7311138, E-mail: 116048164@qq.com

Received: September 10, 2016

Accepted: December 13, 2016

This work was supported by the Scientific Research Foundation of FenYang College of Shanxi Medical University (Grant No.1312)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-358-7311138, E-mail: 116048164@qq.com

网络出版时间: 2017-02-07 15:48:35

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170207.1548.012.html>

patients and healthy people, and in gastric cancer cell HGC-27 and gastric mucosal cell GES-1. The miRNA-181b-5p inhibitors and inhibitors negative control was transfected into gastric cancer cell HGC-27 by Lipofectamine 2000, respectively. Then miRNA-181b-5p was identified by qRT-PCR. The effect of miRNA-181b-5p on the proliferation of gastric cancer cell HGC-27 was detected by CCK-8 assay. The cell apoptosis and cell cycle distribution were analyzed by flow cytometry. The qRT-PCR result showed that the miRNA-181b-5p level in serum of gastric cancer was increased compared with the healthy people ($P<0.05$), and was significantly increased in gastric cancer cell HGC-27 compared with gastric mucosal cell GES-1 ($P<0.01$). The miRNA-181b-5p level in gastric cancer cell was decreased after miRNA-181b-5p inhibitors transfection compared with the inhibitors negative control ($P<0.01$). The result of CCK-8 assay showed that the proliferation of gastric cancer cell HGC-27 was significantly reduced while the miRNA-181b-5p level was reduced ($P<0.01$). The result of flow cytometry showed that the apoptosis of gastric cancer cell HGC-27 was significantly up-regulated after transfection ($P<0.01$), and the proportion of S-stage cells was decreased as well as the proportion of G₂/M-stage cells was increased. The proliferation of gastric cancer cell was inhibited after the transfection of miRNA-181b-5p inhibitors. These results indicated that the serum level of miRNA-181b-5p may act as an molecular marker for early diagnosis of gastric cancer, and miRNA-181b-5p may act as oncogene in the progress and development of gastric cancer and serve as a new target for the molecular treatment of gastric cancer.

Keywords miRNA-181b-5p; gastric cancer; cell cycle; proliferation; apoptosis

微RNA(microRNA, miRNA)是一类长度约为19~25个核苷酸的单链非编码小分子RNA, 主要以完全或不完全互补配对方式结合靶基因mRNA的3'端非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR), 进而在转录后水平负调控靶基因的表达。研究表明, miRNA在肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡、迁移、侵袭以及发育等生命活动过程中起到重要的调控作用, 进而发挥癌基因或抑癌基因的作用^[1]。已有文献报道, miR-181b-5p与宫颈癌^[2]、乳腺癌^[3]、星形胶质细胞瘤^[4]、结肠癌^[5]、慢性白血病^[6]等密切相关。胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁人类健康, 因此对于胃癌的早期诊断和治疗显得尤为重要。有研究发现, 在胃癌组织中miR-181b-5p的水平升高^[7-9], 但其在胃癌患者血清中的水平以及与胃癌之间的相关性, 则鲜有报道且尚存在争议。因此, 本研究检测胃癌患者血清中以及胃癌细胞中miR-181b-5p的水平, 并进一步采用化学合成的miR-181b-5p inhibitors在体外下调胃癌细胞HGC-27中的miR-181b-5p的水平, 进而观察其对胃癌细胞增殖和凋亡的影响, 为miR-181b-5p与胃癌的发病机制之间的相关性提供新的理论依据, 为胃癌的早期诊断和治疗提供有价值的临床信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2015年1月~2016年2月收集山西省汾阳医院初

诊的22例胃癌患者的空腹血清5 mL, 所有胃癌患者未经过化疗、放疗或手术治疗, 排除心脏病、高血压以及糖尿病等疾病, 同时收集同期的健康体检者30例作为对照组。该研究已经获得了医院伦理委员会的批准, 且所有受试对象均知情, 并自愿参加。收集血液标本后, 2 500 r/min离心10 min, 收集血清, 再将血清置于低温高速离心机中, 4 °C, 12 000 r/min离心10 min, 收集血清上清液, 分装于-80 °C冰箱中保存待用。人胃癌细胞HGC-27细胞株购自武汉博士德生物工程有限公司, 人胃黏膜GES-1细胞株由山西医科大学汾阳学院任来峰老师惠赠。

1.2 主要试剂

MEM培养基、DMEM高糖培养基和Opti-MEM培养基购自Hyclone公司。胎牛血清购自杭州四季青公司。Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司。Trizol、miRcute miRNA cDNA第一链合成试剂盒、miRcute miRNA荧光定量检测试剂盒、血清miRNA提取分离试剂盒、miRNA-181b-5p引物以及荧光定量PCR检测所用内参U6及外参均购自北京天根生化科技有限公司。miR-181b-5p inhibitors以及阴性对照购自广州锐博生物科技有限公司。CCK-8试剂盒及细胞周期购自上海碧云天生物技术有限公司。Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒购自凯基生物有限公司。

1.3 主要方法

1.3.1 细胞培养 胃癌细胞HGC-27以及正常胃黏

膜细胞GES-1分别接种于含10%胎牛血清的MEM和DMEM培养基中,在37℃、含5% CO₂的培养箱中培养,平均每隔2~3 d传代。

1.3.2 qRT-PCR检测细胞和血清中miR-181b-5p的水平 采用Trizol法提取细胞中的总RNA,使用DEPC水作为对照,紫外分光光度计检测RNA的浓度以及纯度。取200 μL血清,按照血清miRNA提取试剂说明提取血清中的miRNA。提取的RNA均采用poly(A)加尾法进行逆转录反应。具体过程为:在20 μL逆转录体系中加入2 μg RNA,37℃反应60 min,对miRNA的3'末端进行poly(A)加尾处理,之后取一定量poly(A)修饰的miRNA于37℃反应60 min,进行逆转录反应。将逆转录产物cDNA稀释10倍后,以U6作为内参进行荧光定量PCR(qRT-PCR),检测细胞中miR-181b-5p水平。qRT-PCR检测血清中miR-181b-5p的水平时则采用外参作为参照。PCR反应条件均为:94℃ 2 min;94℃ 20 s,60℃ 34 s,40个循环。反应结束后随即进行熔解曲线分析,以判断是否存在非特异性扩增。采用2^{-ΔΔCt}法计算细胞和血清中miR-181b-5p的水平,期间每组设定3个复孔。

1.3.3 细胞转染 转染前1 d将对数生长期的胃癌细胞HGC-27以2.5×10⁵/孔密度接种于6孔板中,待次日细胞融合度达到50%~60%时,按照Lipofectamine 2000操作说明进行转染,转染6 h后将不含血清培养基更换为含血清的完全培养基,并置于37℃、含5% CO₂的培养箱中继续培养,24 h后荧光显微镜观察转染效率。本实验分为3组,分别为miR-181b-5p inhibitors组、miR-181b-5p inhibitors阴性对照组和空白对照组,其中,miR-181b-5p inhibitors的终浓度为150 nmol/L。

1.3.4 qRT-PCR检测转染后细胞中miR-181b-5p的水平变化 转染终浓度为150 nmol/L的miR-181b-5p inhibitors 48 h后,提取细胞中的总RNA,并测定其浓度和纯度,将其逆转录为cDNA(方法同前1.3.2),以U6为内参使用qRT-PCR法检测各组miR-181b-5p的水平(条件同前1.3.2),以此判断转染效率。

1.3.5 CCK-8法检测miR-181b-5p对细胞增殖的影响 按1.3.3所述方法将miR-181b-5p inhibitors以及inhibitors阴性对照转入HGC-27细胞后,重新将各组细胞消化为单细胞悬液。以4×10³/孔接种于96孔板中,每组设定3个复孔,置于37℃、含5% CO₂的培养箱继续培养,并在24、48、72 h向每孔中直接加入

10 μL CCK-8试剂,继续放置于37℃、含5% CO₂的培养箱培养1 h。使用酶标仪检测波长为450 nm时各孔的吸光度(*D*)值,并绘制细胞增殖曲线。

1.3.6 流式细胞术检测细胞周期的变化 转染48 h后收集各组细胞,PBS洗涤细胞2次,使用70%的乙醇于4℃固定过夜,1 000 r/min离心3 min,收集细胞,再次洗涤后按照说明书向各组中加入一定量的碘化丙啶(propidium iodide, PI)和RNase A,37℃避光孵育30 min,并以50 μm的尼龙膜过滤细胞后,使用流式细胞仪检测细胞中DNA的含量。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡率 转染48 h后使用不含EDTA的胰酶消化并收集细胞,使用PBS洗涤细胞2次,1 000 r/min离心3 min,收集大约3×10⁵细胞沉淀后,向其加入500 μL染色缓冲液以及5 μL Annexin V-FITC并将其混匀,再加入5 μL PI染色液混匀,室温避光20 min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.4 统计学分析

以上所有实验均重复3次,得到的所有数据采用SPSS 16.0软件进行分析,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间的比较采用*t*检验,多组之间的比较采用单因素方差分析,以*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-181b-5p在胃癌患者血清中的水平增高

qRT-PCR结果显示,胃癌患者血清中miR-181b-5p的水平显著高于健康人群,差异具有统计学意义(*P*<0.05,图1)。

2.2 miR-181b-5p在胃癌细胞HGC-27中的水平明显增高

qRT-PCR结果发现,胃癌细胞HGC-27中miR-181b-5p的水平显著高于胃黏膜细胞GES-1,差异具有统计学意义(*P*<0.01,图2)。

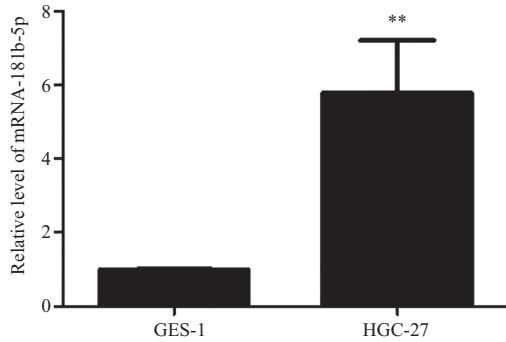
2.3 胃癌细胞HGC-27转染效率的检测

将cy3标记的miR-181b-5p inhibitors以及inhibitors阴性对照转染胃癌细胞HGC-27,24 h后采用流式细胞术检测转染效率,其结果为65%。48 h后采用qRT-PCR分别检测空白对照组、转染miR-181b-5p inhibitors以及inhibitors阴性对照组的胃癌细胞HGC-27中miR-181b-5p的水平。图3的结果显示,转染miR-181b-5p inhibitors的胃癌细胞HGC-27中miRNA-181b-5p的水平显著低于inhibitors阴性对照组,差异具有统计学意义(*P*<0.01);而inhibitors阴性对照组和空白对照组中



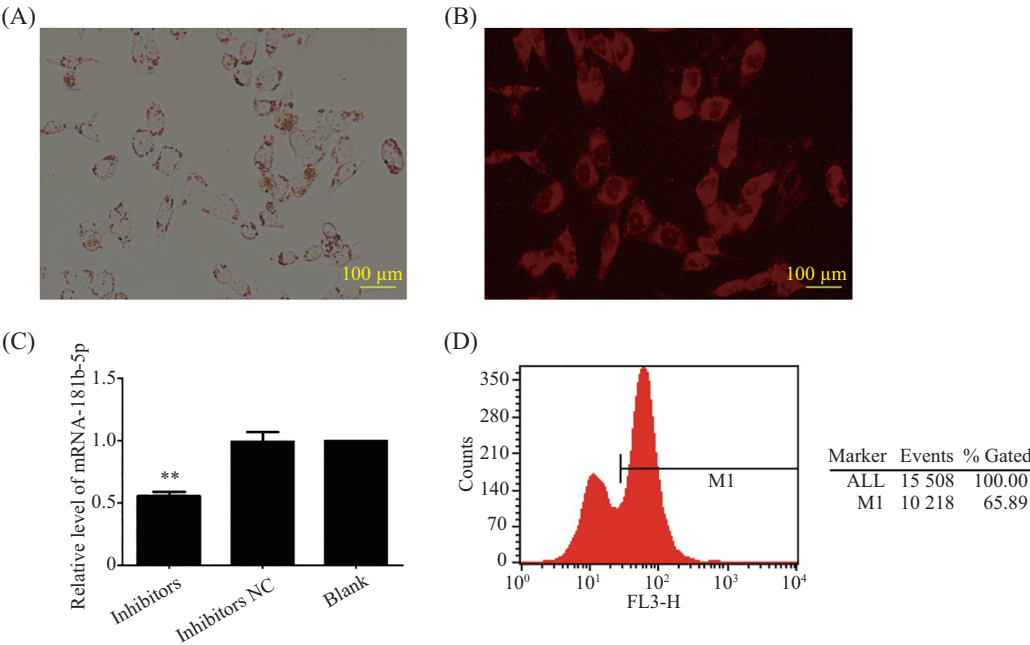
* $P<0.05$, 与健康人群比较。
* $P<0.05$ compared with healthy people.

图1 miRNA-181b-5p在胃癌患者和健康人群血清中的水平
Fig.1 The levels of miRNA-181b-5p in gastric cancer patients and healthy people



** $P<0.01$, 与胃黏膜细胞比较。
** $P<0.01$ compared with gastric mucosal cell GES-1.

图2 miRNA-181b-5p在胃癌细胞HGC-27和人胃黏膜细胞GES-1的水平
Fig.2 The levels of miRNA-181b-5p in gastric cancer cell HGC-27 and gastric mucosal cell GES-1



A: 同一视野的白光对照; B: 绿色激发光下观察细胞内的红色荧光; C: 转染后各组细胞中miRNA-181b-5p的水平, ** $P<0.01$, 与inhibitors阴性对照组(inhibitors NC)比较; D: 流式细胞术检测转染效率。
A: observation of the same field under white light; B: observation of the red fluorescence in the cells under green light; C: the levels of miRNA-181b-5p in gastric cancer cell after transfection, ** $P<0.01$ compared with the group of inhibitors negative control; D: transfection efficiency was detected by flow cytometry.

图3 胃癌细胞HGC-27转染效率的检测
Fig.3 The assessment of transfection efficiency of gastric cell HGC-27

的miR-181b-5p的水平无明显差异,说明转染成功,且胃癌细胞中miRNA-181b-5p的水平被抑制。

2.4 下调miR-181b-5p水平对胃癌细胞HGC-27增殖的影响

CCK-8实验结果显示,与inhibitors阴性对照组相比,转染miR-181b-5p inhibitors后胃癌细胞HGC-27的增殖能力明显减弱,细胞生长受到抑制,尤其以转染后48、72 h明显,差异具有统计学意义($P<0.01$);miR-181b-5p inhibitors阴性对照组与空白对照组之间无统计学差异,该结果表明,抑制miR-181b-5p的水平可以抑制胃癌细胞HGC-27体外的增殖能力(图4)。

2.5 下调miR-181b-5p的水平对胃癌细胞HGC-27细胞周期的影响

流式细胞术检测转染48 h后各组的细胞周期情况。结果发现,转染miR-181b-5p inhibitors使其miR-181b-5p的水平下调后,胃癌细胞HGC-27的S期比例明显下降, G₂/M期比例明显增加,且与inhibitors阴性对照组相比,差异具有统计学意义($P<0.01$)。以上结果表明,miR-181b-5p的水平下调后,细胞阻滞于G₂/M期,使胃癌细胞的生长受到抑制(图5)。

2.6 下调miR-181b-5p水平促进胃癌细胞HGC-27凋亡

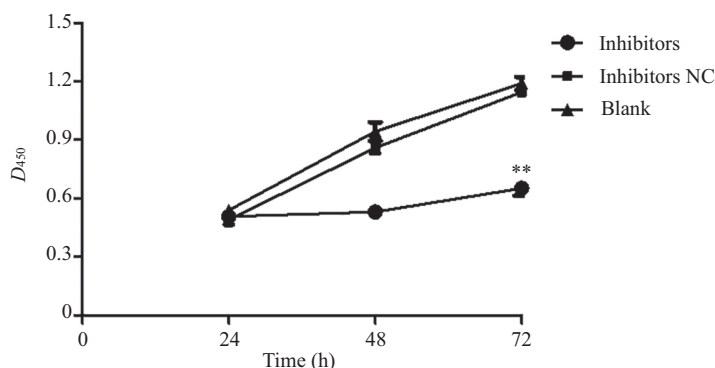
使用Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞的凋亡情况,结果发现,miR-181b-5p inhibitors组、inhibitors阴性对照组及空白组的凋亡率分别为27.66%±1.25%、14.32%±1.08%及12.08%±1.63%,miR-181b-5p inhibitors组的凋亡率显著高于inhibitors阴性对照组,差异具有统计学意义($P<0.01$),而inhibitors阴性对照组与空白对照组相比差异不具有统计学意义($P>0.05$)。此

结果说明,下调miR-181b-5p的水平后,可以促进胃癌细胞HGC-27的凋亡(图6)。

3 讨论

miRNA是近年来分子生物学领域的研究热点之一。作为一种转录后调控因子,它可以在mRNA水平调节靶基因的表达,导致mRNA降解或者抑制转录后翻译。外周血循环中miRNA与组织中miRNA表达相似性较高,具有一定的组织特异性,且在血清或血浆中可以长期稳定存在,因此有可能成为一种新型的血清肿瘤标志物而应用于临床^[10]。

近几年,胃癌相关miRNA异常表达的临床应用已经成为了研究的热点,很多miRNA的异常表达都被证实与胃癌有关。目前,作用机制较为明确的是miRNA-21^[11],它与胃癌的进程及其生存期等都有密切的相关性。此外,还有很多miRNA逐渐被证实通过靶向调控某些基因而影响胃癌的进程,而且机制复杂多样。如Huang等^[12]发现,在胃癌中miR-338-3p靶向E盒结合锌指蛋白2(zinc finger E-box binding homeobox 2, ZEB2)及结肠癌转移相关基因1(metastasis-associated in colon cancer 1, MACC1)而抑制上皮细胞间质转型,过表达miR-338-3p后,胃癌细胞的迁移和侵袭能力减弱,而将miR-338-3p下调后则发现了相反的结果。Zhu等^[13]发现,miR-106a靶向基质金属蛋白酶抑制因子-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)而调控胃癌的侵袭和转移,抑制miR-106a的水平后,胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力减弱。有趣的是,有的miRNA还与化疗的敏感性、生存期及其预后都有密切的关系^[9,14-15]。

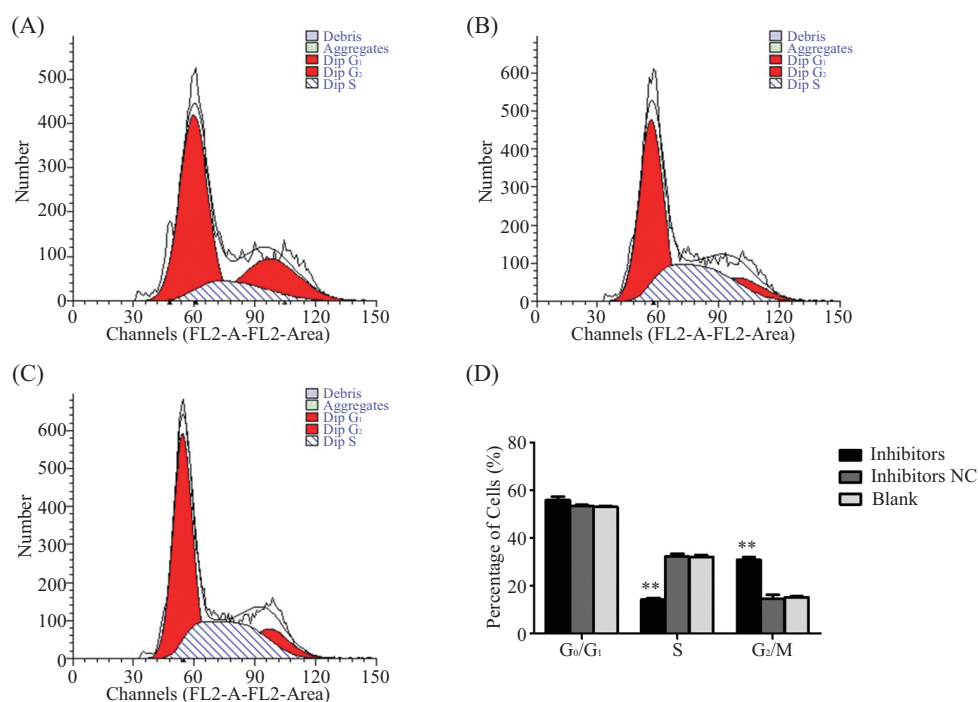


** $P<0.01$, 与inhibitors阴性对照组(inhibitors NC)比较。

** $P<0.01$ compared with the group of inhibitors negative control.

图4 miR-181b-5p对胃癌细胞HGC-27增殖能力的影响

Fig.4 The effect of miR-181b-5p on the proliferation of gastric cancer cell HGC-27

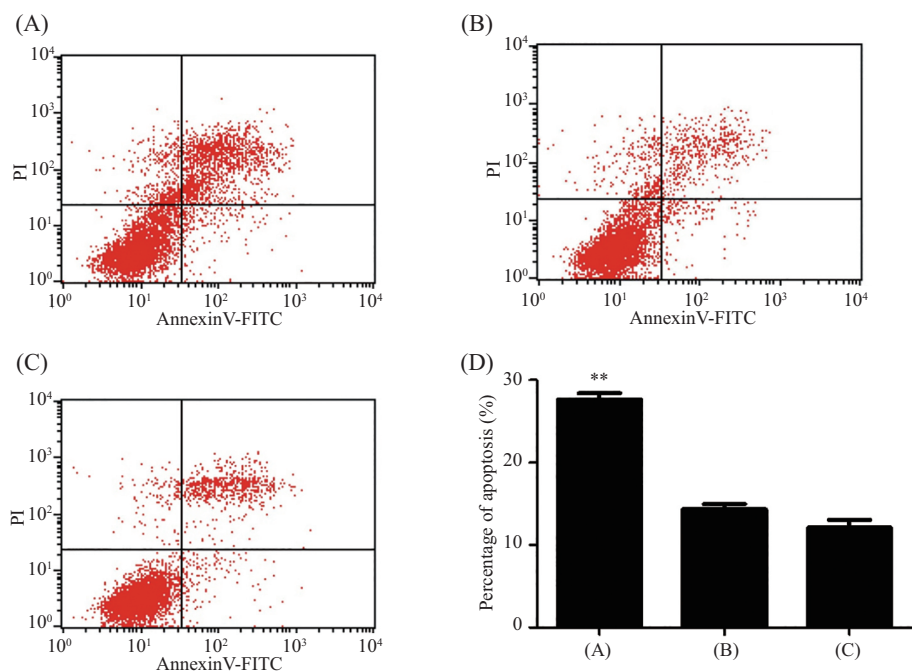


A: miRNA-181b-5p inhibitors组; B: miRNA-181b-5p inhibitors阴性对照组(inhibitors NC); C: 空白对照组; D: 下调miRNA-181b-5p后, HGC-27胃癌细胞S期比例减少。 ** $P < 0.01$, 与inhibitors阴性对照组比较。

A: group of miRNA-181b-5p inhibitors; B: group of miRNA-181b-5p inhibitors negative control; C: group of blank; D: the proportion of HGC-27 gastric cancer cell in S-stage was decreased after the miRNA-181b-5p was reduced. ** $P < 0.01$ compared with the group of inhibitors negative control.

图5 miRNA-181b-5p对细胞周期的影响

Fig.5 The effect of miRNA-181b-5p on the cell cycle distribution of gastric cancer cell



A: miRNA-181b-5p inhibitors组; B: miRNA-181b-5p inhibitors阴性对照组(inhibitors NC); C: 空白对照组; D: 下调miRNA-181b-5p后, HGC-27胃癌细胞凋亡率增加。 ** $P < 0.01$, 与inhibitors阴性对照组(B)比较。

A: group of miRNA-181b-5p inhibitors; B: group of miRNA-181b-5p inhibitors negative control; C: group of blank; D: the apoptosis of HGC-27 gastric cancer cell was increased after the miRNA-181b-5p was reduced. ** $P < 0.01$ compared with the group of inhibitors negative control (B).

图6 miRNA-181b-5p对胃癌细胞凋亡的影响

Fig.6 The effect of miRNA-181b-5p on the apoptosis of gastric cancer cell

以上研究表明,胃癌与miRNA关系密切而且机制复杂,有的miRNA可以靶向调节原癌基因起到抑制肿瘤的作用,而某些miRNA则可以通过靶向调节抑癌基因而发挥着促进肿瘤发生、发展的作用。

miRNA-181b-5p被证实在多种肿瘤中表达异常,如宫颈癌、乳腺癌、星形胶质细胞瘤、结肠癌等^[2-5],而血清miR-181b-5p的水平还可以作为结肠癌^[6]、非小细胞肺癌^[7]等的诊断标志物。有学者发现,miR-181b-5p在胃癌组织中的水平显著高于正常组织^[9-10,18],同时,miR-181b-5p水平较高的胃癌患者其生存期明显缩短,对奥沙利铂的敏感性下降^[7]。还有学者发现,胃癌中异常表达的miR-181b-5p有可能成为胃癌诊断的标志物^[19-20]。因此,本研究首先比较胃癌细胞HGC-27与正常胃黏膜细胞GES-1中miR-181b-5p的水平,结果发现,胃癌细胞显著高于正常胃黏膜细胞,并且进一步检测胃癌患者血清中miR-181b-5p的水平发现,其血清中miR-181b-5p的水平也明显高于健康人群。此结果与国内外报道的miR-181b-5p在胃癌组织中高表达的结果相一致,同时也说明胃癌血清中miR-181b-5p的水平和组织中的表达有较高的一致性,提示血清miR-181b-5p有可能作为一个新型的分子肿瘤标志物应用于临床检测。为了进一步探索miR-181b-5p对胃癌细胞生物学行为的影响,本研究采用脂质体转染技术将miR-181b inhibitors以及阴性对照转入胃癌细胞HGC-27中,使得胃癌细胞HGC-27中原来高表达的miR-181b-5p下调。采用CCK-8法检测胃癌细胞的增殖能力,其结果显示,下调miR-181b-5p水平后,胃癌细胞HGC-27的增殖能力明显减弱。同时,采用了流式细胞术检测转染后各组胃癌细胞的细胞周期和凋亡情况,结果发现,与阴性对照组相比,miR-181b-5p inhibitors组的胃癌细胞HGC-27的凋亡率明显增加。细胞周期检测结果显示,miR-181b-5p的水平被抑制后,S期比例降低,G₂/M期比例增加,细胞阻滞于G₂/M期,以致生长受到抑制。以上结果说明,抑制miRNA-181b-5p的水平后,胃癌细胞HGC-27增殖受到抑制,并且细胞凋亡增加,推测在胃癌中miR-181b-5p有可能作为一个癌基因靶向调控某些基因的表达,改变细胞周期、促进细胞凋亡,进而导致细胞的异常增殖。也有研究证实了我们的猜测,如Zhou等^[21]发现,miRNA-181b参与并促进了转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)诱导的胃癌细胞HGC-27的

迁移、侵袭以及上皮间质转化,而且增高的miRNA-181b靶向抑制基质金属蛋白酶抑制剂3(tissue inhibitor of metalloproteinase 3, Timp3)的表达,进而抑制细胞的凋亡,促进细胞迁移和侵袭。因此,胃癌中miRNA-181b水平增加可以引起胃癌细胞生物学行为的改变,进而促进胃癌的进程。

此外,在其他肿瘤中,miRNA-181b也具有类似的作用。如有学者发现,在Eca109食管癌细胞的球形形成细胞中,miR-181b的水平增加,并且可以通过信号转导和转录活化因子3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)途径而增加细胞克隆的数量和大小,抑制miR-181b的水平可以诱导细胞凋亡^[22]。同时,miR-181b可以靶向抑制肿瘤抑制因子(cylindromatosis, CYLD)的水平进而发挥其癌基因的作用。在甲状腺乳头状癌^[23]中,下调miR-181b可以靶向调控CYLD的表达进而促进细胞凋亡。在卵巢癌中发现,miR-181b靶向大肿瘤抑制因子2(large tumor suppressor homolog 2, LATS2)促进细胞的增殖和侵袭^[24];在宫颈癌中,miR-181b则是靶向AC9进而促进细胞的增殖,同时抑制细胞凋亡^[2]。在肝星状细胞中,miR-181b靶向P27促进细胞的增殖^[25]。这些结果说明,miRNA-181b-5p和众多的靶基因之间形成了复杂的功能网络,它可以调控不同的靶基因进而引起细胞周期、凋亡、侵袭等生物学行为的改变,且这些结果与本研究抑制miRNA-181b水平后产生的结果相类似,这也进一步表明,miRNA-181b对多种肿瘤细胞的生物学功能具有重要的调控能力,可能与多种肿瘤的发生密切相关。

综上所述,本文首次证实了在胃癌患者血清中miRNA-181b的表达增高,因此,miRNA-181b-5p有望成为胃癌早期诊断的一个分子肿瘤标志物,但还需进一步扩大样本量进行验证。同时,我们还发现,异常表达的miR-181b与胃癌细胞HGC-27的增殖与凋亡密切相关,抑制miR-181b的表达可以促进胃癌细胞的凋亡,抑制胃癌细胞的增殖。因此,miRNA-181b可能成为胃癌治疗的新的靶分子。我们将采用生物学技术预测并验证miRNA-181b在胃癌中可能的作用机制,从而为胃癌的早期诊断、预后判断及治疗提供重要的理论和实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Zhang BH, Pan XP, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as

- oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302(1): 1-12.
- 2 Yang L, Wang YL, Liu S, Zhang PP, Chen Z, Liu M, *et al.* MiR-181b promotes cell proliferation and reduces apoptosis by repressing the expression of adenyl cyclase 9 (AC9) in cervical cancer cells. *FEBS Lett* 2014; 588(1): 124-30.
- 3 Zheng Y, Lü X, Wang X, Wang B, Shao X, Huang Y, *et al.* MiR-181b promotes chemoresistance in breast cancer by regulating Bim expression. *Oncol Reporter* 2016; 35(2): 683-90.
- 4 Zhi F, Wang Q, Deng DN, Shao NY, Wang R, Xue L, *et al.* MiR-181b-5p downregulates NOVA1 to suppress proliferation, migration and invasion and promote apoptosis in astrocytoma. *PLoS One* 2014; 9(10): e109124.
- 5 Nakajima G, Hayashi K, Xi YG, Kudo K, Uchida K, Takasaki K, *et al.* Non-coding microRNAs has-let-7g and hsa-miR-181b are associated with chemoresistance to S1 in colon cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 2006; 3(5): 317-24.
- 6 Visone R, Veronese A, Balatti V, Croce CM. MiR-181b: New perspective to evaluate disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* 2012; 3(2): 195-202.
- 7 Jiang JT, Zheng X, Xu X, Zhou Q, Yan XG, Lu BF, *et al.* Prognostic significance of miR-181b and miR-21 in gastric cancer patients treated with S-1/oxaliplatin or doxifluridine/oxaliplatin. *PLoS One* 2011; 6(8): e23271.
- 8 Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, *et al.* Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: A microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 2010; 11(2): 136-46.
- 9 Smid D, Kulda V, Srbecka K, Kubackova D, Dolezal J, Daum O, *et al.* Tissue microRNAs as predictive markers for gastric cancer patients undergoing palliative chemotherapy. *Int J Oncol* 2016; 48(6): 2693-703.
- 10 Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, *et al.* Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18(10): 997-1006.
- 11 Zhang ZY, Li ZJ, Gao CP, Chen P, Chen JJ, Liu WZ, *et al.* MiR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Invest* 2008; 88(12): 1358-66.
- 12 Huang N, Wu ZZ, Lin L, Zhou MY, Wang L, Ma HR, *et al.* MiR-338-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells by targeting ZEB2 and MACC1/Met/Akt signaling. *Oncotarget* 2015; 6: 15222-34.
- 13 Zhu M, Zhang N, He SX, Lui YY, Lu GF, Zhao L. MicroRNA-106a targets TIMP2 to regulate invasion and metastasis of gastric cancer. *FEBS Lett* 2014; 588(4): 600-7.
- 14 Zhang Y, Lu QP, Cai X. MicroRNA-106a induces multidrug resistance in gastric cancer by targeting RUNX3. *FEBS Lett* 2013; 587(18): 3069-75.
- 15 Cai BB, An Y, Lü N, Chen J, Tu M, Sun J, *et al.* MiRNA-181b increases the sensitivity of pancreatic ductal adenocarcinoma cells to gemcitabine *in vitro* and in nude mice by targeting BCL-2. *Oncol Rep* 2013; 29(5): 1769-76.
- 16 Wang J, Huang SK, Zhao M, Yang M, Zhong JL, Gu YY, *et al.* Identification of a circulating microRNA signature for colorectal cancer detection. *PLoS One* 2014; 9(4): e87451.
- 17 Tian F, ShenYT, Chen ZZ, Li R, Lu JF, Ge QY, *et al.* Aberrant miR-181b-5p and miR-486-5p expression in serum and tissue of non-small cell lung cancer. *Gene* 2016; 591(2): 338-43.
- 18 Wang JB, Wang QW, Liu H, Hu B, Zhou W, Cheng YF, *et al.* MicroRNA expression and its implication for the diagnosis and therapeutic strategies of gastric cancer. *Cancer Lett* 2010; 297(2): 137-43.
- 19 Cai H, Xu JP, Han YF, Lu Z, Han T, Ding Y, *et al.* Integrated miRNA-risk gene-pathway pair network analysis provides prognostic biomarkers for gastric cancer. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 2975-86.
- 20 Guo JX, Tao QS, Lou PR, Chen XC, Chen J, Yuan GB. MiR-181b as a potential molecular target for anticancer therapy of gastric neoplasms. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(5): 2263-7.
- 21 Zhou Q, Zheng X, Chen LJ, Xu B, Jiang JT, Wu CP. Smad2/3/4 pathway contributes to TGF- β -induced MiRNA-181b expression to promote gastric cancer metastasis by targeting timp3. *Cell Physiol Biochem* 2016; 39(2): 453-66.
- 22 Xu DD, Zhou PJ, Wang Y, Zhang L, Fu WY, Ruan BB, *et al.* Reciprocal activation between STAT3 and miR-181b regulates the proliferation of esophageal cancer stem-like cells via the CYLD pathway. *Mol Cancer* 2016; 15(40): 1-15.
- 23 Li DF, Jian W, Wei CK, Song HM, GuYF, Luo Y, *et al.* Down-regulation of miR-181b promotes apoptosis by targeting CYLD in thyroid papillary cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(11): 7672-80.
- 24 Xia Y, Gao Y. MicroRNA-181b promotes ovarian cancer cell growth and invasion by targeting LATS2. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 447(3): 446-51.
- 25 Wang BC, Li WX, Guo K, Xiao YT, Wang YQ, Fan JG, *et al.* MiR-181b promotes hepatic stellate cells proliferation by targeting P27 and is elevated in the serum of cirrhosis patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 421(1): 4-8.