

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.11.002

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2021.11.002>

· 论著 ·

MiR-4739通过下调MIEN1表达抑制胃癌NCI-N87细胞恶性生长和转移的机制

同永刚, 戴维, 杜工亮, 党星波

(陕西省人民医院急诊外科, 西安 710068)

[摘要] 目的: 研究miR-4739对胃癌NCI-N87细胞恶性生长和转移的影响及其机制。方法: 采用qRT-PCR检测胃黏膜上皮GES-1细胞和胃癌HGC-27、NCI-N87、HS-746T细胞中miR-4739表达水平。在胃癌NCI-N87细胞中转染miR-4739 mimics后, 采用CCK-8检测细胞增殖、流式细胞术检测凋亡、Transwell小室检测迁移和侵袭、蛋白质印迹法检测剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(C-caspase-3)、波形蛋白(Vimentin)和上皮性钙黏附素(E-cadherin)的表达。采用在线靶基因预测软件预测miR-4739的靶基因, 随后采用荧光素酶报告系统鉴定二者的靶向关系。在胃癌NCI-N87细胞共转染miR-4739 mimics和迁移侵袭增强因子1(MIEN1)过表达载体pcDNA-MIEN1后, 检测细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力以及C-caspase-3、Vimentin和E-cadherin表达情况。结果: 胃癌HGC-27、NCI-N87、HS-746T细胞中miR-4739表达水平均低于胃黏膜上皮GES-1细胞, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。胃癌NCI-N87细胞转染miR-4739 mimics后, 与转染miR-mimics-NC相比, 细胞增殖、迁移、侵袭能力降低, 细胞凋亡率升高, E-cadherin、C-caspase-3蛋白表达水平升高, Vimentin蛋白表达水平下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。miR-4739可靶向抑制MIEN1表达。胃癌NCI-N87细胞共转染miR-4739 mimics和pcDNA-MIEN1后, 与共转染miR-4739 mimics和pcDNA相比, 细胞增殖、迁移、侵袭能力升高, 细胞凋亡率降低, E-cadherin、C-caspase-3蛋白表达水平减少, Vimentin蛋白表达水平升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: MiR-4739可通过靶向抑制MIEN1表达阻碍胃癌NCI-N87细胞的恶性生长和转移潜能。

[关键词] miR-4739; 胃癌; 凋亡; 转移; 迁移侵袭增强因子1

MiR-4739 inhibits malignant growth and metastasis of gastric cancer NCI-N87 cells through down-regulating the expression of MIEN1

TONG Yonggang, DAI Wei, DU Gongliang, DANG Xingbo

(Department of Emergency Surgery, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract **Objective:** To study the effects and mechanism of miR-4739 on malignant growth and metastasis of gastric cancer NCI-N87 cells. **Methods:** The expression level of miR-4739 in gastric epithelial GES-1 cells and gastric

收稿日期 (Date of reception): 2021-02-11

通信作者 (Corresponding author): 党星波, Email: Dangxb2006@163.com

cancer HGC-27, NCI-N87, HS-746T cells were detected by qRT-PCR. After transfection of miR-4739 mimics into gastric cancer NCI-N87 cells, CCK-8 was used to detect cell proliferation, flow cytometry was used to detect apoptosis, Transwell chamber was used to detect migration and invasion, and Western blot was used to detect the expression of cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (C-caspase-3), Vimentin and epithelial cadherin (E-cadherin). The online target gene prediction software was used to predict the target gene of miR-4739, and then the luciferase reporter system was used to identify their targeting relationship. After co-transfection of miR-4739 mimics and migration and invasion enhancer 1 (MIEN1) overexpression vector pcDNA-MIEN1 into gastric cancer NCI-N87 cells, the cell proliferation, apoptosis, migration and invasion, and the expression of C-caspase-3, Vimentin and E-cadherin were detected. **Results:** The expression levels of miR-4739 in gastric cancer HGC-27, NCI-N87 and HS-746T cells were significantly lower than that in gastric epithelial GES-1 cells ($P<0.05$). After transfection of miR-4739 mimics into gastric cancer NCI-N87 cells, compared with the cells transfected with miR-mimics-NC, the cell proliferation, migration and invasion ability were decreased, the cell apoptosis rate was increased, the protein expression levels of E-cadherin and C-caspase-3 were increased, and the protein expression level of Vimentin was decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). miR-4739 could targeted inhibit the expression of MIEN1. After co-transfection of miR-4739 mimics and pcDNA-MIEN1 into gastric cancer NCI-N87 cells, compared with the cells co-transfected with miR-4739 mimics and pcDNA, the cell proliferation, migration and invasion ability were increased, the cell apoptosis rate was decreased, the protein expression levels of E-cadherin and C-caspase-3 were decreased, and the protein expression level of Vimentin was increased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** MiR-4739 can block the malignant growth and metastatic potential of gastric cancer NCI-N87 cells through targeting inhibition of MIEN1's expression.

Keywords miR-4739; gastric cancer; apoptosis; metastasis; migration and invasion enhancer 1

胃癌发病速度快、恶性程度高、易转移,已成为世界范围内的公共卫生问题^[1]。近年来,随着分子生物学的不断进步与发展,广大研究者发现肿瘤的发生与基因异常表达有关。肿瘤相关基因参与调控肿瘤细胞的恶性生长和转移潜能,因此分子靶向治疗可能是延长肿瘤患者生存时间的途径^[2]。MiRNA(microRNA)一种非编码RNA,没有开放阅读框,在人体各个组织中均有表达,广泛参与调控细胞的多种生物学行为^[3]。目前发现miRNA在人类疾病中具有重要作用,可影响疾病进展,因此有望成为疾病治疗的分子靶点^[4]。近年来有研究^[5]表明:miR-4739与肿瘤进展有关,其在前列腺癌中发挥抑制作用,下调其表达可促进前列腺癌细胞增殖和迁移。胃癌的相关研究^[6]显示:肿瘤细胞恶性程度降低时,miR-4739表达水平上调。但是,miR-4739在胃癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡中的作用及其机制还不十分明确,因此,本实验以胃癌NCI-N87细胞作为研究对象,分析miR-4739在胃癌细胞恶性生长和转移中的作用和调控机制,为分子靶向治疗胃癌提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

胃癌HGC-27、NCI-N87、HS-746T细胞购自南京科佰生物科技有限公司;胃黏膜上皮GES-1细胞购自上海雅吉生物科技有限公司;miR-4739 mimics及其对照miR-mimics-NC购自广州市锐博生物科技有限公司;波形蛋白(Vimentin)抗体、剪切的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3, C-caspase-3)抗体、迁移侵袭增强因子1(migration and invasion enhancer 1, MIEN1)抗体及二抗购自厦门慧嘉生物科技有限公司;上皮性钙黏附素(epithelial cadherin, E-cadherin)抗体及二抗购自美国Proteintech公司;MIEN1过表达载体(pcDNA-MIEN1)及其阴性对照载体(pcDNA)由云舟生物科技(广州)有限公司构建。

1.2 qRT-PCR检测miR-4739表达

在胃黏膜上皮GES-1细胞和胃癌HGC-27、NCI-N87、HS-746T细胞中分别添加TRIzol试剂,

提取细胞总RNA, 用紫外分光光度计测定OD₂₆₀/OD₂₈₀值, 分析RNA样品浓度和纯度。配制反转录体系, 包括: 2 μg的RNA样品、2 μL的Random primer、1 μL的dT primer、4 μL的RT-buffer、0.5 μL的inhibitor、2 μL的dNTP、0.5 μL的RTase, 补充DEPC水至20 μL。反转录反应条件为: 25 °C, 10 min; 50 °C, 60 min; 90 °C, 5 min; 4 °C, 1 min。PCR引物如下: miR-4739(正向)5'-GCTGGGACATTGAAAGTCTCA-3'; miR-4739(反向)5'-GATGTTCCCATCGGCGTGTC-3'。配制PCR体系, 包括: 10 μL的2×Real-time PCR Master mix、2 μL的cDNA、0.4 μL的正、反向引物、0.2 μL的Taq DNA polymerase, 添加ddH₂O至20 μL。PCR反应程序为: 95 °C, 3 min; 95 °C, 12 s; 62 °C, 40 s, 共40个循环。按照2^{-ΔΔCt}法计算miR-4739表达变化。

1.3 细胞转染和分组

胃癌NCI-N87细胞于对数生长期分别转染miR-mimics-NC和miR-4739 mimics, 分别命名为miR-NC组和miR-4739组; 没有转染的细胞为Control组。转染方法: 用250 μL Opti-MEM分别稀释5 μL Lipofectamine 2000脂质体和100 pmol(5 μL) miR-4739 mimic或3 μg目的质粒, 随后按照转染试剂说明进行转染。Control组、miR-NC组、miR-4739组细胞转染后24 h, 按照1.2中qRT-PCR方法检测miR-4739表达。

1.4 CCK-8 检测细胞增殖

Control组、miR-NC组、miR-4739组胃癌NCI-N87细胞转染后, 分别接种到96孔板中, 每个孔中接种4×10³个细胞, 继续培养24 h以后, 在每个孔内添加10 μL的CCK-8溶液, 置于37 °C继续反应2 h。在酶标仪上测定490 nm的OD值, OD值反映细胞增殖能力。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

转染后24 h, Control组、miR-NC组、miR-4739组细胞分别用0.25%的胰蛋白酶消化, 将细胞悬浮在PBS溶液中, 以800×g离心10 min, 将上清弃掉, 添加400 μL的结合缓冲液, 混合后, 再分别取5 μL的Annexin V-FITC和PI染液添加到细胞内, 混合后, 添加100 μL的结合缓冲液后用流式细胞仪测定。

1.6 Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭

转染后, 用不含血清的细胞培养液分别将

Control组、miR-NC组、miR-4739组细胞悬浮。以8 μm孔径的Transwell小室检测细胞迁移和侵袭, 在细胞侵袭实验之前, 需要用Matrigel将Transwell小室湿化。细胞迁移和侵袭实验其余步骤相同: 在Transwell小室的下室内添加500 μL的含有10%胎牛血清的细胞培养液, 在Transwell小室的上室内添加200 μL的上述细胞悬浮液, 放在37 °C继续孵育24 h; 将小室取出, 用PBS洗涤, 95%乙醇固定, 0.5%结晶紫染色; 在显微镜下(×100)随机选择5个视野计数细胞穿膜数目, 结果取平均值。

1.7 蛋白质印迹法检测 C-caspase-3、E-cadherin、Vimentin 蛋白表达

分别取培养24 h后的Control组、miR-NC组、miR-4739组细胞, 添加RIPA裂解试剂, 置于冰上裂解20 min, 在4 °C, 以10 000×g离心10 min, 收集上清, 以BCA方法检测浓度。在蛋白样品内添加Loading Buffer混合, 放在100 °C的水浴中结合5 min。以常规方法制备分离胶和浓缩胶, 按照每个孔内添加40 μg蛋白样品上样, 设置电泳仪初始电泳电压为60 V, 肉眼可见染料移动到分离胶以后, 把电压设置为100 V, 直至染料运动到玻璃板的底部边缘, 停止电泳。将凝胶取出, 裁剪NC膜, 在4 °C条件下转膜, 转膜电流为200 mA恒流。将NC膜放在5%脱脂奶粉溶液中, 于37 °C孵育1 h, 然后将NC膜放在一抗稀释溶液中, 放在4 °C孵育过夜。取过夜后的NC膜, 放在二抗稀释液中, 在37 °C孵育1 h。ECL方法显色, ImageJ分析条带灰度值。目的蛋白表达水平=目的条带灰度值/内参β-actin灰度值。

1.8 MiR-4739 靶基因预测及验证

在线靶基因预测软件TargetScan(http://www.targetscan.org/vert_72/)预测miR-4739的靶基因, 通过荧光素酶系统鉴定二者的靶向关系。把MIEN1-WT、MIEN1-MUT(北京华大基因公司提供)分别和miR-mimics-NC、miR-4739 mimics共转染到胃癌NCI-N87细胞中, 24 h后, 采用荧光素酶活性检测试剂盒检测荧光素酶活性变化。

1.9 MIEN1 过表达载体对 miR-4739 作用影响检测

在胃癌NCI-N87细胞中分别共转染miR-4739 mimics和pcDNA、miR-4739 mimics和pcDNA-MIEN1, 分别命名为miR-4739+vector组和miR-4739+MIEN1组。继续培养24 h后, 以CCK-8检测细胞增殖、流式细胞术检测凋亡、Transwell

小室检测迁移和侵袭、蛋白质印迹法检测 C-caspase-3、E-cadherin、Vimentin、MIEN1 蛋白表达, 步骤同前。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件分析数据。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组数据间比较用 *t* 检验, 多组差异比较用单因素方差分析、组间两两比较用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-4739 在胃癌细胞中相对低表达

胃癌 HGC-27、NCI-N87、HS-746T 细胞中 miR-4739 的相对表达量分别为 0.35 ± 0.04 、 0.21 ± 0.03 、 0.60 ± 0.06 , 均低于胃黏膜上皮 GES-1 细胞 (1.01 ± 0.06 ; $F=441.292$, $P<0.001$); 胃癌 NCI-N87 细胞中 miR-4739 的表达水平低于胃癌 HGC-27 及 HS-746T 细胞, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 因此用表达水平最低的胃癌 NCI-N87 细胞进行后续研究。

2.2 上调 miR-4739 对胃癌 NCI-N87 细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和 EMT 蛋白表达的影响

转染 miR-4739 mimics 后, 胃癌 NCI-N87 细胞

中 miR-4739 的相对表达量为 2.33 ± 0.14 , 较 miR-NC 组 (1.00 ± 0.09) 与 Control 组 (1.03 ± 0.07) 显著升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 提示 miR-4739 mimics 可上调胃癌 NCI-N87 细胞中 miR-4739 表达水平。

转染 miR-4739 mimics 后, 与 miR-NC 组比较, 胃癌 NCI-N87 细胞增殖能力降低、凋亡率升高、细胞迁移和侵袭数目减少、C-caspase-3 和 E-cadherin 蛋白表达水平升高、Vimentin 蛋白表达水平降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。提示上调 miR-4739 可抑制胃癌 NCI-N87 细胞增殖、迁移、侵袭和上皮细胞间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 并可诱导细胞凋亡 (图 1, 表 1)。

2.3 miR-4739 靶向抑制 MIEN1 表达

经在线靶基因预测软件分析发现, miR-4739 和 MIEN1 的 3'-UTR 端有互补结合位点; miR-4739 mimics 和野生型 WT-MIEN1 共转染以后, 细胞荧光素酶活性显著降低 ($P<0.05$), 而与突变型 MUT-MIEN1 共转染后细胞荧光素酶活性无显著改变 ($P>0.05$); 转染 miR-4739 mimics 后, 胃癌 NCI-N87 细胞中 MIEN1 蛋白表达水平为 0.35 ± 0.04 , 显著低于 miR-NC 组 (0.69 ± 0.05) 和 Control 组 (0.68 ± 0.06 ; $F=132.609$, $P<0.001$), 提示 miR-4739 可靶向抑制 MIEN1 表达 (图 2, 表 2)。

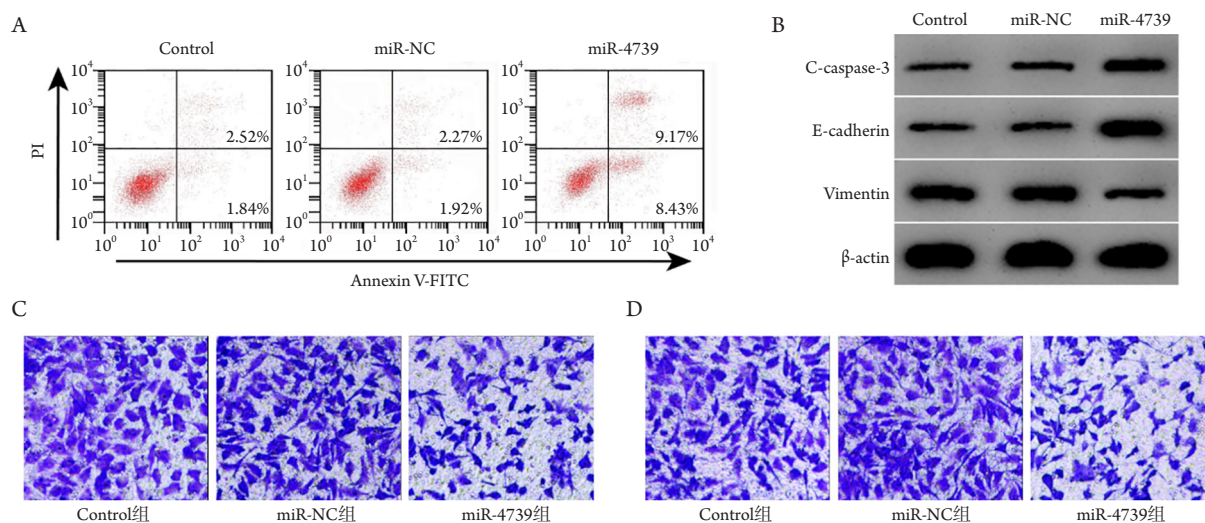


图1 上调miR-4739对胃癌NCI-N87细胞凋亡、迁移、侵袭和EMT蛋白表达的影响

Figure 1 Effect of up-regulation of miR-4739 on apoptosis, migration, invasion and EMT protein expression of gastric cancer NCI-N87 cells

(A) 细胞凋亡; (B) C-caspase-3、E-cadherin、Vimentin 蛋白表达; (C) 细胞迁移; (D) 细胞侵袭。

(A) Cell apoptosis; (B) Protein expression of C-caspase-3, E-cadherin and Vimentin; (C) Cell migration; (D) Cell invasion.

表1 上调miR-4739后胃癌NCI-N87细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭和EMT蛋白表达($n=9, \bar{x} \pm s$)Table 1 Proliferation, apoptosis, migration, invasion and EMT protein expression of gastric cancer NCI-N87 cells after up-regulating miR-4739 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	OD值	凋亡率/%	C-caspase-3	迁移数目	侵袭数目	E-cadherin	Vimentin
Control组	0.510.05	4.26 ± 0.27	0.29 ± 0.04	216.43 ± 20.72	185.01 ± 14.61	0.32 ± 0.04	0.62 ± 0.06
miR-NC组	0.520.06	4.27 ± 0.29	0.31 ± 0.04	217.32 ± 24.42	183.36 ± 16.86	0.32 ± 0.05	0.62 ± 0.06
miR-4739组	0.290.04 [#]	17.51 ± 1.66 [#]	0.52 ± 0.07 [#]	121.68 ± 18.28 [#]	112.50 ± 11.58 [#]	0.70 ± 0.07 [#]	0.41 ± 0.04 [#]
<i>F</i>	61.978	544.015	52.282	59.989	73.242	142.325	42.860
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与Control组比较, * $P<0.05$; 与miR-NC组比较, [#] $P<0.05$ 。

Compared with Control group, * $P<0.05$; compared with miR-NC group, [#] $P<0.05$.

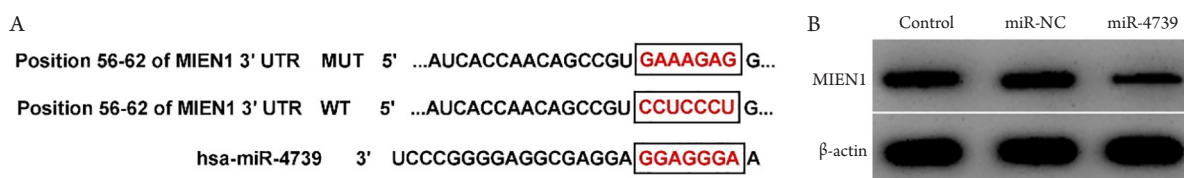


图2 miR-4739靶向抑制MIEN1表达

Figure 2 miR-4739 targeted inhibits MIEN1 expression

(A) miR-4739和MIEN1的3'UTR端结合位点示意图; (B) 蛋白质印迹法检测MIEN1蛋白表达。

(A) Schematic diagram of the binding sites of miR-4739 and 3'UTR of MIEN1; (B) Western blot was used to detect the protein expression of MIEN1.

表2 荧光素酶活性($n=9, \bar{x} \pm s$)Table 2 Luciferase activity ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	MUT-MIEN1	WT-MIEN1
miR-NC组	1.01 ± 0.09	1.00 ± 0.11
miR-4739组	1.01 ± 0.08	0.36 ± 0.05 [*]
<i>t</i>	0.136	11.310
<i>P</i>	0.893	<0.001

与miR-NC组比较, * $P<0.05$ 。

Compared with miR-NC group, * $P<0.05$.

2.4 MIEN1 过表达载体对上调 miR-4739 影响胃癌 NCI-N87 细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和 EMT 蛋白表达的作用

与 miR-4739+vector 组相比, 共转染 miR-4739 mimics 和 pcDNA-MIEN1 后, 胃癌 NCI-N87 细胞增殖能力升高、细胞凋亡率降低、细胞侵袭和迁移数目增加、E-cadherin 和 C-caspase-3 蛋白表达水平降低、Vimentin 和 MIEN1 蛋白表达水平升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$, 图 3, 表 3)。

表3 共转染miR-4739 mimics和pcDNA-MIEN1后胃癌NCI-N87细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭、EMT蛋白及MIEN1蛋白表达($n=9, \bar{x} \pm s$)Table 3 Proliferation, apoptosis, migration, invasion, EMT protein and MIEN1 protein expression of gastric cancer NCI-N87 cells after co-transfection of miR-4739 mimics and pcDNA-MIEN1 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	OD值	凋亡率/%	C-caspase-3	迁移数目
miR-4739+vector组	0.28 ± 0.04	17.50 ± 1.60	0.53 ± 0.07	119.68 ± 19.58
miR-4739+MIEN1组	0.47 ± 0.04 [*]	12.76 ± 1.15 [*]	0.34 ± 0.06 [*]	173.10 ± 24.23 [*]
<i>t</i>	10.252	7.362	6.185	5.144
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

续表3

组别	侵袭数目	E-cadherin	Vimentin	MIEN1
miR-4739+vector组	114.89 ± 12.40	0.71 ± 0.06	0.41 ± 0.04	0.35 ± 0.04
miR-4739+MIEN1组	166.06 ± 14.11*	0.30 ± 0.05*	0.57 ± 0.05*	0.78 ± 0.05*
<i>t</i>	8.172	15.407	7.722	21.811
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与miR-4739+vector组比较, **P*<0.05。

Compared with miR-4739+vector group, **P*<0.05.

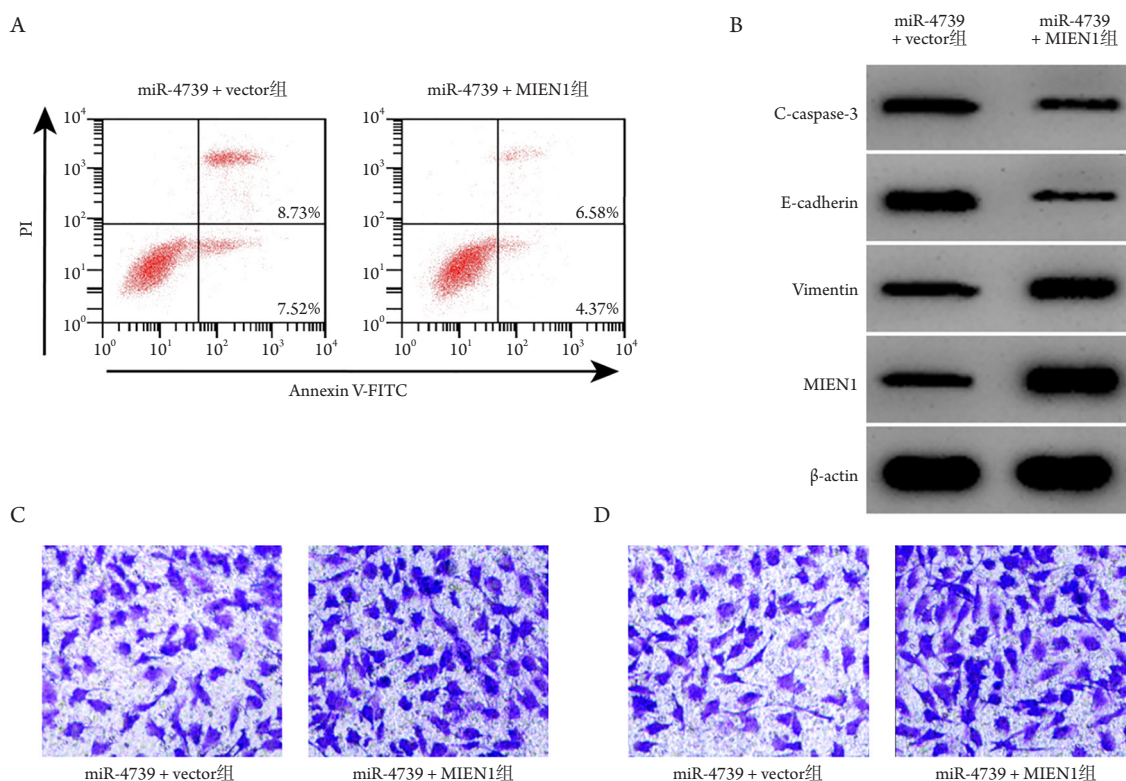


图3 共转染miR-4739 mimics和pcDNA-MIEN1对胃癌NCI-N87细胞凋亡、迁移、侵袭、EMT蛋白和MIEN1蛋白表达的影响
Figure 3 Effects of co-transfection of miR-4739 mimics and pcDNA-MIEN1 on apoptosis, migration, invasion, EMT protein and MIEN1 protein expression of gastric cancer NCI-N87 cells

(A)细胞凋亡; (B)C-caspase-3、E-cadherin、Vimentin、MIEN1蛋白表达; (C)细胞迁移; (D)细胞侵袭。

(A) Cell apoptosis; (B) Protein expression of C-caspase-3, E-cadherin, Vimentin and MIEN1; (C) Cell migration; (D) Cell invasion.

3 讨论

MiRNA作用广泛, 在自然界生命体内普遍表达, 参与机体正常生理活动和疾病进展。MiRNA可影响疾病进展, 因此可能是疾病治疗的靶点^[7]。肿瘤组织中miRNA表达水平与正常组织有明显差异, 这些差异表达的miRNA可通过影响下游基因的表达进而发挥多种生物学作用^[8]。既往研究发现,

miR-4739可在前列腺癌中发挥抑制作用, 下调其表达可促进前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭^[5]。在胃癌中发现, 下调癌基因表达水平的胃癌细胞中miR-4739表达水平上调^[6]。本实验显示: miR-4739在胃癌HGC-27、NCI-N87、HS-746T细胞系中的表达水平均明显低于正常胃黏膜上皮细胞, 并且在NCI-N87细胞中的表达水平最低, 因此选择具有高转移特性的未分化胃癌细胞系NCI-N87进行后

续实验。随后通过上调miR-4739表达发现, 胃癌NCI-N87细胞的增殖、迁移、侵袭能力均下降, 且细胞凋亡增多, 提示miR-4739在胃癌恶性生长和转移中发挥抑制作用。

细胞凋亡是一个十分复杂的过程, 与细胞内多个基因的共同调控作用有关^[9]。Caspase含有多个蛋白成员, 其在正常情况下以没有活性的酶原形式存在, 只有剪切活化以后才可诱导细胞凋亡发生^[10]。Caspase蛋白成员活化后可形成凋亡级联反应, 最终促进细胞凋亡发生^[11]。Caspase-3是Caspase凋亡反应的下游因子, 在细胞凋亡中发挥执行作用, 其被剪切活化后的产物C-caspase-3也被认为是细胞凋亡的标志^[12]。EMT在胚胎发育、组织生长和修复等过程中发挥重要作用, 是指上皮细胞表型逐渐消失, 间质细胞表型逐渐显现的过程^[13]。肿瘤细胞发生EMT后, 其转移概率大大增加, 因此EMT也被认为是细胞转移的早期标志^[14]。E-cadherin是上皮细胞标志蛋白, 在肿瘤组织中异常低表达, 参与维持肿瘤细胞分化状态, 其表达缺失或降低与胃癌、结肠癌等恶性表型、预后及生存率有关^[15-16]; 上调E-cadherin蛋白表达, 可以逆转胃癌NCI-N87细胞的EMT状态^[17]。Vimentin是间质细胞标志蛋白, 其表达升高后肿瘤细胞侵袭能力增加^[18]; 上调Vimentin蛋白表达, 可以增强胃癌NCI-N87细胞的迁移和侵袭能力, 增强对细胞毒药物的耐药性^[19]。E-cadherin与Vimentin表达情况可反映肿瘤细胞EMT情况。本研究表明: 在上调miR-4739表达后的胃癌细胞中, C-caspase-3、E-cadherin蛋白表达增加, Vimentin蛋白表达减少, 提示上调miR-4739可诱导胃癌细胞凋亡并抑制胃癌细胞EMT, 进一步说明了上调miR-4739具有抗胃癌细胞恶性表型的作用。

miRNA不能编码蛋白质, 但可通过影响下游靶基因的表达发挥作用, 此机制是目前研究最为透彻的miRNA作用机制^[20-22]。本研究发现: miR-4739与MIEN1的3'UTR端有互补结合位点, 双荧光素酶报告基因实验证实二者具有靶向结合关系, 且上调miR-4739可靶向抑制MIEN1表达。MIEN1是一个在肿瘤中高表达的调控因子, 能够诱导肿瘤进展、促进肿瘤细胞侵袭和迁移^[23-25]。针对胃癌的研究^[26]显示: MIEN1高表达可促进胃癌细胞生长和转移。本研究发现: MIEN1可逆转上调miR-4739对胃癌细胞生长和转移的抑制作用, 提示miR-4739可通过靶向抑制MIEN1表达参与胃癌细胞恶性生物学调控过程。

综上, miR-4739可能具有抑制胃癌进展的作用, 上调其表达可抑制胃癌细胞生长、迁移、侵袭和EMT, 并可促进细胞凋亡, 其机制可能与靶向下调MIEN1有关, 这为靶向分子治疗胃癌提供了可能的方向。以后我们将继续研究以深入探讨miR-4739靶向MIEN1的下游调控机制, 并通过TCGA数据库对miR-4739在胃癌组织中的表达、临床意义及其与MIEN1的相关性进行进一步深入研究。

参考文献

1. Biagioni A, Skalamera I, Peri S, et al. Update on gastric cancer treatments and gene therapies[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38(3): 537-548.
2. Oue N, Sentani K, Sakamoto N, et al. Molecular carcinogenesis of gastric cancer: Lauren classification, mucin phenotype expression, and cancer stem cells[J]. *Int J Clin Oncol*, 2019, 24(7): 771-778.
3. Vos PD, Leedman PJ, Filipovska A, et al. Modulation of miRNA function by natural and synthetic RNA-binding proteins in cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(19): 3745-3752.
4. Mollaei H, Safaralizadeh R, Rostami Z. MicroRNA replacement therapy in cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12369-12384.
5. Wang XB, Chen QJ, Wang X, et al. ZEB1 activated-VPS9D1-AS1 promotes the tumorigenesis and progression of prostate cancer by sponging miR-4739 to upregulate MEF2D[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122: 109557.
6. Dong L, Deng J, Sun ZM, et al. Interference with the β -catenin gene in gastric cancer induces changes to the miRNA expression profile[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(9): 6973-6983.
7. Xu XY, Wang YM, Mojumdar K, et al. A-to-I-edited miRNA-379-5p inhibits cancer cell proliferation through CD97-induced apoptosis[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(12): 5343-5356.
8. El Majzoub RE, Fayyad-Kazan M, Nasr El Dine A, et al. A thiosemicarbazone derivative induces triple negative breast cancer cell apoptosis: possible role of miRNA-125a-5p and miRNA-181a-5p[J]. *Genes Genomics*, 2019, 41(12): 1431-1443.
9. Bolivar BE, Vogel TP, Bouchier-Hayes L. Inflammatory caspase regulation: maintaining balance between inflammation and cell death in health and disease[J]. *FEBS J*, 2019, 286(14): 2628-2644.
10. Tang YS, Zhao YH, Zhong Y, et al. Neferine inhibits LPS-ATP-induced endothelial cell pyroptosis via regulation of ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway[J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(9): 727-738.
11. Bernard A, Chevrier S, Beltjens F, et al. Cleaved caspase-3 transcriptionally regulates angiogenesis-promoting chemotherapy

- resistance[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(23): 5958-5970.
12. Kuo WT, Shen L, Zuo L, et al. Inflammation-induced occludin downregulation limits epithelial apoptosis by suppressing caspase-3 expression[J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(5): 1323-1337.
 13. Tang C, Liu TJ, Wang K, et al. Transcriptional regulation of FoxM1 by HIF-1 α mediates hypoxia-induced EMT in prostate cancer[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(4): 1307-1318.
 14. Yusufu A, Shayimu P, Tuerdi R, et al. TFF3 and TFF1 expression levels are elevated in colorectal cancer and promote the malignant behavior of colon cancer by activating the EMT process[J]. *Int J Oncol*, 2019, 55(4): 789-804.
 15. Wong SHM, Fang CM, Chuah LH, et al. E-cadherin: its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 121: 11-22.
 16. Padmanaban V, Krol I, Suhail Y, et al. E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer[J]. *Nature*, 2019, 573(7774): 439-444.
 17. Wu YJ, Lin SH, Din ZH, et al. Sinulariolide inhibits gastric cancer cell migration and invasion through downregulation of the EMT process and suppression of FAK/PI3K/AKT/mTOR and MAPKs signaling pathways[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(12): 668.
 18. Jiang YN, Ni XY, Yan HQ, et al. Interleukin 6-triggered ataxia-telangiectasia mutated kinase activation facilitates epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer by upregulating vimentin expression[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 381(2): 165-171.
 19. Wang T, Li N, Jin LF, et al. The calcium pump PMCA4 prevents epithelial-mesenchymal transition by inhibiting NFATc1-ZEB1 pathway in gastric cancer[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867(12): 118833.
 20. Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues[J]. *Nature*, 2017, 542(7642): 450-455.
 21. Bitetti A, Mallory AC, Golini E, et al. MicroRNA degradation by a conserved target RNA regulates animal behavior[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25(3): 244-251.
 22. Müller S, Bley N, Glaß M, et al. IGF2BP1 enhances an aggressive tumor cell phenotype by impairing miRNA-directed downregulation of oncogenic factors[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(12): 6285-6303.
 23. Kpetemey M, Chaudhary P, Van Treuren T, et al. MIEN1 drives breast tumor cell migration by regulating cytoskeletal-focal adhesion dynamics[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(34): 54913-54924.
 24. Chu YC, Hu XL, Wang GF, et al. Downregulation of miR-136 promotes the progression of osteosarcoma and is associated with the prognosis of patients with osteosarcoma[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(6): 5210-5218.
 25. 姚慧欣, 王钧峰, 吴金涛, 等. miR-136-5p靶向MIEN1对宫颈癌细胞侵袭和迁移的调节及机制研究[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2020, 41(3): 362-368.
YAO Huixin, WANG Junfeng, WU Jintao, et al. The regulation and mechanism of miR-136-5p targeting MIEN1 on the invasion and migration of cervical cancer cells[J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University. Medical Sciences*, 2020, 41(3):362-368.
 26. Yu XY, Xiao WJ, Song H, et al. CircRNA_100876 sponges miR-136 to promote proliferation and metastasis of gastric cancer by upregulating MIEN1 expression[J]. *Gene*, 2020, 748: 144678.

本文引用: 同永刚, 戴维, 杜工亮, 党星波. MiR-4739通过下调MIEN1表达抑制胃癌NCI-N87细胞恶性生长和转移的机制[J]. *临床与病理杂志*, 2021, 41(11): 2500-2507. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.11.002

Cite this article as: TONG Yonggang, DAI Wei, DU Gongliang, DANG Xingbo. MiR-4739 inhibits malignant growth and metastasis of gastric cancer NCI-N87 cells through down-regulating the expression of MIEN1[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2021, 41(11): 2500-2507. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2021.11.002