



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.05.06

文章编号: 2095-1264(2022)05-0592-07

miR-876 靶向 Pax6 抑制胃癌细胞增殖、侵袭和迁移

宗 静¹, 郑 扬¹, 李启成², 蒋梦婷³, 韩少静¹, 向正国¹

(中国人民解放军联勤保障中心第 904 医院¹消化内科,²急诊科,³呼吸内科, 江苏 无锡, 214100)

摘要: **目的** 探讨 miR-876 靶向 Pax6 对胃癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响。**方法** 采用 RT-qPCR 检测胃癌组织与癌旁组织中 miR-876 和 Pax6 的表达水平, 分析 miR-876 表达与胃癌患者临床指标的关系。检测胃上皮细胞 GES-1 以及胃癌细胞 MGC-803、BGC-823、SGC-7901 中 miR-876 的表达水平。将 MGC-803 细胞分为对照组、miR-876 mimic 组、mimic-NC 组和 miR-876 mimic+pcDNA-3.1-Pax6 组, 采用 RT-qPCR 和 Western blotting 检测各组细胞中 miR-876 以及 Pax6 的 mRNA 和蛋白表达水平; MTT 检测各组细胞增殖情况; Transwell 检测各组细胞迁移和侵袭情况; 双荧光素酶实验验证 miR-876 与 Pax6 的靶向关系。**结果** 与癌旁组织相比, miR-876 在胃癌组织中低表达($t=13.962$, $P<0.05$), 而 Pax6 mRNA 和蛋白在胃癌组织中均呈高表达($t=23.368$, 13.757 ; $P<0.05$), 且两者呈负相关($r=-0.434$, $P<0.05$)。miR-876 低表达与胃癌患者 TNM 分期($\chi^2=12.000$, $P<0.05$)和淋巴结转移($\chi^2=15.705$, $P<0.05$)有关。细胞实验发现, miR-876 在胃癌细胞系 MGC-803、BGC-823、SGC-7901 中均低表达($P<0.05$); 转染 miR-876 mimic 后, miR-876 表达水平显著升高, 细胞增殖能力减弱, 迁移和侵袭能力均受到抑制($P<0.05$)。双荧光素酶实验结果表明: miR-876 能够靶向结合 Pax6。与 mimic-NC 组比, miR-876 mimic 组 Pax6 mRNA 和蛋白表达水平显著下降($P<0.05$); 与 miR-876 mimic 组比, miR-876 mimic+pcDNA-3.1-Pax6 组细胞增殖、迁移和侵袭能力均显著提高($P<0.05$)。**结论** miR-876 靶向 Pax6 可抑制胃癌细胞 MGC-803 的增殖、侵袭和迁移。

关键词: miR-876; Pax6; 胃癌; 增殖; 侵袭; 迁移

中图分类号: R375.2 **文献标识码:** A

miR-876 targeting Pax6 inhibits the proliferation, invasion and migration of gastric cancer cells

ZONG Jing¹, ZHENG Yang¹, LI Qicheng², JIANG Mengting³, HAN Shaojing¹, XIANG Zhengguo¹

(¹Department of Gastroenterology, ²Department of Emergency, ³Department of Respiratory Medicine, the 904 Hospital of the Joint Logistic Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Wuxi, 214100, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of miR-876 targeting Pax6 on the proliferation, invasion and migration of gastric cancer cells. **Methods** RT-qPCR was used to detect the expressions of miR-876 and Pax6 in gastric cancer tissues and para-carcinoma tissues, and the relationship was analyzed between miR-876 expression and clinical indicators of gastric cancer patients. The expression of miR-876 in gastric epithelial cells GES-1 and gastric cancer cells MGC-803, BGC-823 and SGC-7901 were also detected. MGC-803 cells were divided into control group, miR-876 mimic group, mimic NC group and miR-876 mimic+pcDNA-3.1-Pax6 group. The expressions of miR-876 as well as Pax6 mRNA and protein in each group were detected by RT-qPCR and Western blotting. The cell proliferation in each group was detected by MTT, and the cell migration and invasion by Transwell. The targeting relationship between miR-876 and Pax6 was verified by double luciferase assay. **Results** Compared with para-carcinoma tissues, the miR-876 was lowly expressed in gastric

作者简介: 宗静, 女, 住院医师, 研究方向: 消化系统疾病及内镜诊治。

*通信作者: 向正国, 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 胃肠激素与胃肠动力方面疾病的诊治。

cancer tissues ($t=13.962$, $P<0.05$), while Pax6 mRNA and protein were highly expressed in gastric cancer tissues ($t=23.368$, 13.757 , all $P<0.05$), and there was a negative correlation between them ($r=-0.434$, $P<0.05$). The low expression of miR-876 was associated with TNM stage ($\chi^2=12.000$, $P<0.05$) and lymph node metastasis ($\chi^2=15.705$, $P<0.05$). Cell experiment found that miR-876 was also lowly expressed in gastric cancer cell line MGC-803, BGC-823, SGC-7901 ($P<0.05$). After miR-876 mimic transfection, miR-876 expression levels increased significantly, and the cell proliferation was weakened, both migration and invasion were inhibited ($P<0.05$). The results of double luciferase assay showed that miR-876 could target Pax6. Compared with the mimic-NC group, Pax6 mRNA and protein expression levels decreased significantly in the miR-876 mimic group ($P<0.05$). Compared with the miR-876 mimic group, the proliferation, migration and invasion ability of miR-876 mimic+pcDNA-3.1-Pax6 group were significantly improved ($P<0.05$). **Conclusion** miR-876 targeting Pax6 inhibits the proliferation, invasion and migration MGC-803 gastric cancer cells.

Keywords: miR-876; Pax6; Gastric cancer; Proliferation; Invasion; Migration

前言

胃癌是临床上常见的消化系统恶性肿瘤。近年来,随着医疗技术的飞速发展,胃癌的检出率越来越高^[1]。但是,由于胃癌早期没有特异性的临床症状,发现时多数处于中晚期,治疗难度显著增加,患者预后也非常差,5年生存率不足30%^[2]。因此,探索胃癌发生发展的分子机制对于发现胃癌治疗的新方向及新策略具有重要意义。国内外许多研究发现,微小RNA(microRNA, miRNA)在恶性肿瘤的发生发展中起着重要的作用^[3]。miR-876是miRNA中重要的一员,在肝癌、肺癌等恶性肿瘤细胞的增殖、侵袭等方面具有重要作用^[4-6],但其在胃癌中的作用研究还比较少。Pax6是配对框(paired box, Pax)基因家族的一员,在胃癌组织中表达下调,可抑制胃癌的发生发展^[7]。因此,本研究从分子水平探讨miR-876调控Pax6对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响,从而为胃癌患者的靶向治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床标本收集及处理 从本院收集50例胃癌组织及对应的癌旁组织,所有胃癌患者均经病理学检查确诊,其中男27例,女23例,年龄(51.08 ± 8.26)岁,中位年龄50岁。本研究经联勤保障中心第904医院伦理委员会批准。

1.2 细胞系 胃上皮细胞GES-1以及胃癌细胞MGC-803、BGC-823、SGC-7901,均购买于中国科学院上海科学研究院细胞资源中心。

1.3 主要试剂 RPMI-1640培养基购买于上海元龙生物技术有限公司;磷酸盐缓冲液、完全培养基(EMEM)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DNA

提取试剂盒、PCR纯化试剂盒、miRcute miRNA荧光定量检测试剂盒、DNA聚合酶、Lipofectamine 2000转染试剂、引物合成、OPTI-MEM、MTT试剂盒均购买于美国Thermo Fisher公司;质粒pmirGLO-Basic、SacI内切酶、XhoI内切酶、荧光素酶报告基因检测系统均购买于上海浩然生物技术有限公司;miR-876 mimic、mimic-NC和pcDNA-3.1-Pax6均购买于上海吉玛制药技术有限公司;鼠抗人 β -actin单克隆抗体(ab8226)、鼠抗人Pax6单克隆抗体(ab197768)、羊抗鼠二抗(ab6789)均购买于上海碧云天生物技术有限公司。

1.4 主要仪器 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱、低温高速离心机购买于德国Eppendorf公司;紫外分光光度计、二氧化碳细胞培养箱、恒温水浴箱均购买于上海隆拓仪器设备有限公司;Wes全自动蛋白质印迹定量分析仪购买于美国Protein Simple公司;移液枪购买于上海姚氏仪器设备厂;BX-51M光学显微镜购买于日本奥林巴斯公司;PCR仪、E-Gel Imager凝胶成像系统购买于美国Thermo Fisher公司。

1.5 实验方法

1.5.1 RT-qPCR检测胃癌组织、胃上皮细胞GES-1及胃癌细胞中miR-876表达水平 提取胃癌组织、胃上皮细胞GES-1以及胃癌细胞MGC-803、BGC-823、SGC-7901中的总RNA,使用聚丙烯酰胺凝胶对小RNA进行提纯,采用miRcute miRNA第一链cDNA合成试剂盒进行miR-876第一链cDNA合成,采用miRcute miRNA荧光定量检测试剂盒并按照试剂盒说明的体系放入PCR管,进行cDNA扩增,PCR反应条件为:第一个循环: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min;第二个循环: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 34 s。按照每孔的最低循环数值(cycle threshold, Ct),将U6作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算miR-876表达水平。引物设计:miR-876

正向:5'-TGGATTTCTTTGTGAAAAACACCA-3',反向:5'-AACGAGACGACGACAGAC-3';U6 正向:5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATAT-3',反向:5'-AAAATATGGAACGCTTCACGAA-3';Pax6 正向:5'-AGACACAGCCCTCACAAAC-3',反向:5'-ATCATAACTCCGCCCATTC-3'; β -actin 正向:5'-TTGTTACCAACTGGGACG-3',反向:5'-CCAGAGGCATACAGGGAC-3'。选取 MGC-803 细胞用于后续实验,将细胞分为对照组、miR-876 mimic 组、mimic-NC 组和 miR-876 mimic+pcDNA-3.1-Pax6 组。

1.5.2 RT-qPCR 和 Western blotting 检测细胞中 miR-876 以及 Pax6 mRNA 和蛋白表达水平 采用 RT-qPCR 检测各组细胞中 miR-876 以及 Pax6 的 mRNA 表达水平,方法同 1.5.1。Western blotting 检测:取对数生长期细胞进行胰酶消化,1 500 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min,去掉培养基;采用 PBS 培养基将 1 mL 细胞重悬,1 500 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min,去掉上清液,通过细胞沉淀来提取蛋白。配置 SDS-PAGE 凝胶,每组取 10 μ L 蛋白样品进行电泳、转膜、染色、封闭、一抗(稀释比 1:1 000)孵育、洗膜、二抗(稀释比 1:5 000)孵育、洗膜,最后加入 ECL 反应 3 min,然后进行胶片曝光,曝光时间根据光强度的不同而调整,最长不超过 3 min,然后显影 2 min,最后定影,随后采用凝胶图像分析成像系统进行灰度分析。

1.5.3 MTT 法检测细胞增殖 每组设置 3 个复孔,取对数生长期细胞进行胰酶消化并传代,采用 PBS 培养基将细胞重悬,取 200 μ L 细胞液,将 1 000~10 000 个细胞接种到 96 孔板上,置于 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养箱中进行培养,在终止培养前 4 h 加入 20 μ L 5 $mg \cdot mL^{-1}$ MTT,继续培养,随后将 96 孔板内的培养液丢弃,每孔再加入 100 μ L DMSO,充分振荡 10 min,将其中的沉淀充分溶解以后,停止反应。将未转染细胞孔设置为零点,转染 miRNA 时间作为计时起点,分别在 24、48、72 h 取一块 96 孔板进行 MTT 检测。

1.5.4 Transwell 检测细胞迁移和侵袭 Transwell 检测各组细胞迁移情况:在 24 孔板中放入 Transwell 小室,上室加入 1×10^5 个细胞,下室加入 600 μ L 含 10% FBS 的完全培养基,置于 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。取出 24 孔板,PBS 清洗 3 次,1% 戊二醛固定 30 min,结晶紫染色 30 min。在正置显微镜下随机选取 6 个视野,观察小室外膜穿过的细胞,并

进行计数。Transwell 检测各组细胞侵袭情况:取 Matrigel 胶在冰上融化,用预冷的无血清培养基稀释,加入 Transwell 小室,置于 37 $^{\circ}C$ 培养箱中孵育 2 h,后续步骤同细胞迁移实验,在正置显微镜下随机选取 6 个视野计数。

1.5.5 采用双荧光素酶实验验证 miR-876 与 Pax6 的靶向关系 采用 TargetScan 网站预测 miR-876 与 Pax6 的结合位点。Pax6 的 3'-UTR 片段包括野生型和突变型目标序列,将 Pax6 的 3'-UTR 区构建至荧光素酶报告基因载体,将野生型和突变型 Pax6 3'-UTR 和 miR-876 共转染到 MGC-803 细胞中,按照要求培养 48 h,随后将转染细胞进行荧光素酶报告实验。本次实验所用载体为 psi-CHECKTM-2,共包含海肾荧光素酶报告基因及萤火虫荧光素酶报告基因,以萤火虫荧光素酶报告基因作为内对照,采用双荧光素酶报告分析系统进行荧光素酶活性分析,以验证 miR-876 与 Pax6 的靶向关系。

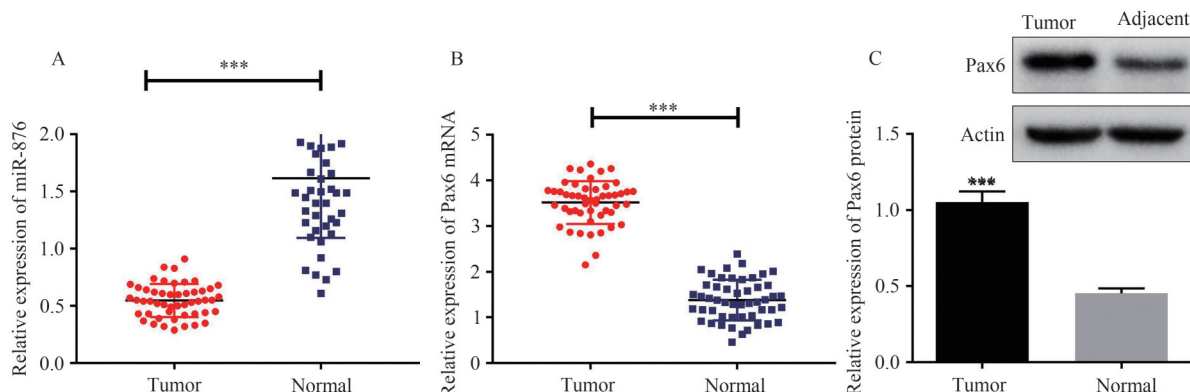
1.6 数据统计 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,两组间比较采用独立样本 t 检验;多组间计量资料的比较采用单因素方差分析,采用 SNK- q 检验进行组间两两比较;计数资料采用卡方检验;相关性检验采用 Pearson 相关性分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织与癌旁组织中 miR-876 及 Pax6 mRNA 和蛋白表达水平 胃癌组织中 miR-876 的表达水平 (0.55 ± 0.14) 显著低于癌旁组织 (1.62 ± 0.52) ($t = 13.962$, $P < 0.05$),而 Pax6 mRNA 和蛋白表达水平 [(3.52 ± 0.47) (1.05 ± 0.07)] 均显著高于癌旁组织 [(1.38 ± 0.45) (0.45 ± 0.03)] ($t = 23.368$, 13.757 ; $P < 0.05$) (图 1)。

2.2 胃癌组织中 miR-876 与 Pax6 mRNA 表达水平的相关性及 miR-876 表达与胃癌临床指标的关系 胃癌组织中 miR-876 的表达水平与 Pax6 mRNA 表达水平呈负相关 ($r = -0.434$, $P < 0.05$) (图 2)。以 miR-876 平均表达水平 0.55 为界, ≥ 0.55 设为 miR-876 高表达组, < 0.55 设为 miR-876 低表达组。结果发现,miR-876 低表达与患者 TNM 分期 ($\chi^2 = 12.000$, $P < 0.05$)、淋巴结转移 ($\chi^2 = 15.705$, $P < 0.05$) 有关,而与年龄、性别及肿瘤大小均无关 ($P > 0.05$) (表 1)。

2.3 各组细胞中 miR-876 表达水平 与胃上皮细



注: (A) 胃癌组织与癌旁组织中 miR-876 表达水平; (B) 胃癌组织与癌旁组织中 Pax6 mRNA 表达水平; (C) 胃癌组织与癌旁组织中 Pax6 蛋白表达水平。与癌旁组织相比, *** $P < 0.001$ 。

Note: (A) The expression level of miR-876 in gastric cancer tissue and paracancerous tissue; (B) Pax6 mRNA expression level in gastric cancer tissue and paracancerous tissue; (C) Pax6 protein expression level in gastric cancer tissue and paracancerous tissue. Compared with the adjacent tissues, *** $P < 0.001$.

图 1 胃癌组织与癌旁组织中 miR-876 及 Pax6 mRNA 和蛋白表达水平

Fig. 1 Expression levels of miR-876, Pax6 mRNA and protein in gastric cancer tissue and paracancerous tissue

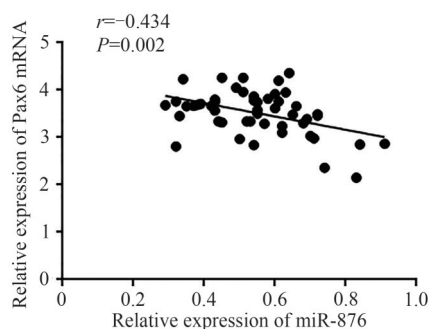


图 2 胃癌组织中 miR-876 与 Pax6 mRNA 表达的相关性

Fig. 2 Correlation between expressions of miR-876 and Pax6 mRNA in gastric cancer tissue

胞 GES-1 中 miR-876 的表达水平相比, 各胃癌细胞系中 miR-876 的表达水平均显著降低 ($P < 0.05$) (图 3A)。miR-876 mimic 组 MGC-803 细胞中 miR-876 表达水平较对照组和 mimic-NC 组显著升高 ($P < 0.05$), 说明转染成功 (图 3B)。

2.4 miR-876 对 MGC-803 细胞增殖的影响 转染 24、48、72 h 后, miR-876 mimic 组 MGC-803 细胞 OD_{490} 值较对照组和 mimic-NC 组显著下降 ($F = 238.838, 19.170, 7.035; P < 0.05$) (图 4)。

2.5 miR-876 对 MGC-803 细胞迁移和侵袭的影响 miR-876 mimic 组 MGC-803 细胞迁移和侵袭能力较对照组和 mimic-NC 组显著下降 ($P < 0.05$) (图 5)。

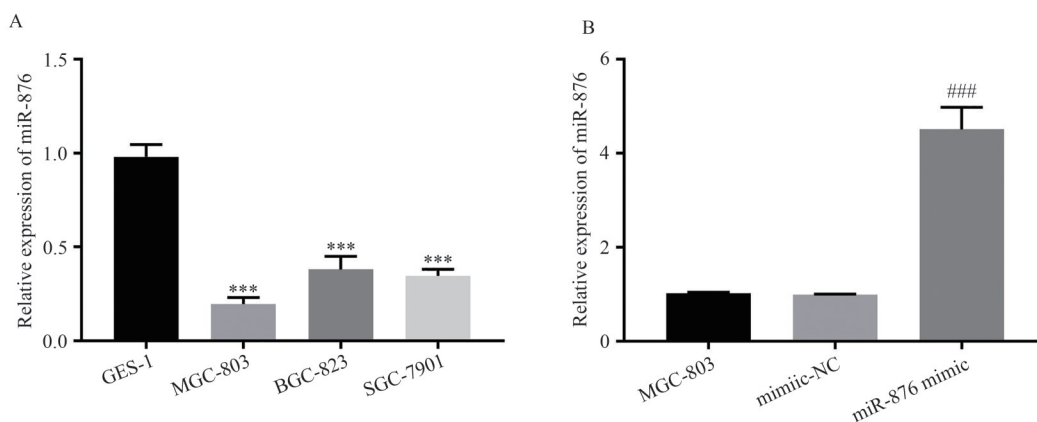
2.6 miR-876 靶向 Pax6 TargetScan 网站预测结果显示, miR-876 与 Pax6 存在结合位点 (图 6A)。双荧光素酶实验证实, 野生型 Pax6 的 miR-876 mimic

表 1 miR-876 表达与胃癌患者临床指标的关系

Tab. 1 Relationship between the expression of miR-876 and clinical indicators in patients with gastric cancer

临床指标	例数	miR-876	miR-876	χ^2	P
		高表达 (n=25)	低表达 (n=25)		
年龄/岁					
<50	22	9	13	1.299	0.254
≥50	28	16	12		
性别					
男	27	14	13	0.081	0.777
女	23	11	12		
肿瘤大小					
<5 cm	26	11	15	1.282	0.258
≥5 cm	24	14	10		
TNM分期					
I + II	20	16	4	12.00	0.001
III + IV	30	9	21	0	
淋巴转移					
有	26	6	20	15.70	<0.001
无	24	19	5	5	

组荧光素酶活性显著低于 mimic NC 组 ($P < 0.05$), 而突变型 Pax6 的 miR-876 mimic 组荧光素酶活性与 mimic-NC 组无显著差异 (图 6B)。RT-qPCR 和 Western blotting 结果显示, miR-876 mimic 组 Pax6

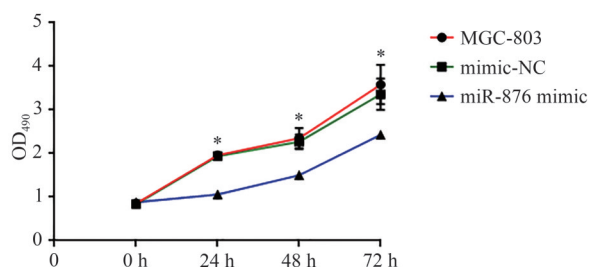


注: (A) 胃上皮细胞、胃癌细胞系中 miR-876 表达水平; (B) 转染后 MGC-803 细胞中 miR-876 表达水平。与胃上皮细胞相比, *** $P < 0.001$; 与 MGC-803 细胞相比, ### $P < 0.001$ 。

Note: (A) Expression level of miR-876 in gastric epithelial cells and gastric cancer cell lines; (B) Expression level of miR-876 in MGC-803 cells after transfection. Compared with the gastric epithelial cells, *** $P < 0.001$; Compared with MGC-803 cells, ### $P < 0.001$

图 3 胃上皮细胞、胃癌细胞系及转染后 MGC-803 细胞中 miR-876 表达水平

Fig. 3 Expression of miR-876 in gastric epithelial cells, gastric cancer cell lines and MGC-803 cells after transfection



注: 与 MGC-803 细胞相比, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with MGC-803 cells, * $P < 0.05$.

图 4 miR-876 对 MGC-803 细胞增殖的影响

Fig. 4 Effect of miR-876 on the proliferation of MGC-803 cells

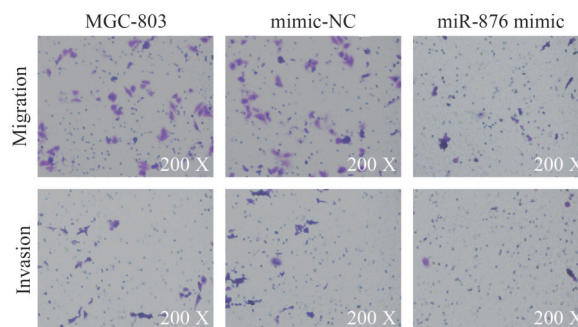
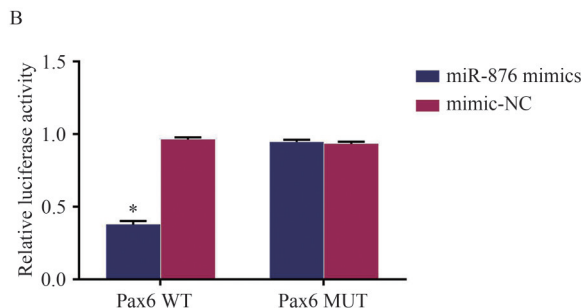
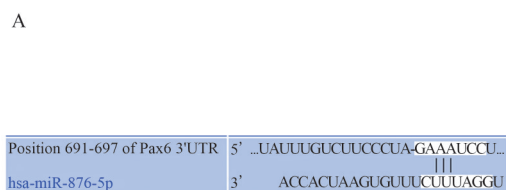


图 5 miR-876 对 MGC-803 细胞迁移和侵袭的影响

Fig. 5 Effects of miR-876 on migration and invasion of MGC-803 cells



注: (A) miR-876 与 Pax6 的结合位点; (B) 荧光素酶活性。与 mimic NC 相比, * $P < 0.05$ 。

Note: (A) The binding site of miR-876 and Pax6; (B) The luciferase activity. Compared with mimic NC, * $P < 0.05$.

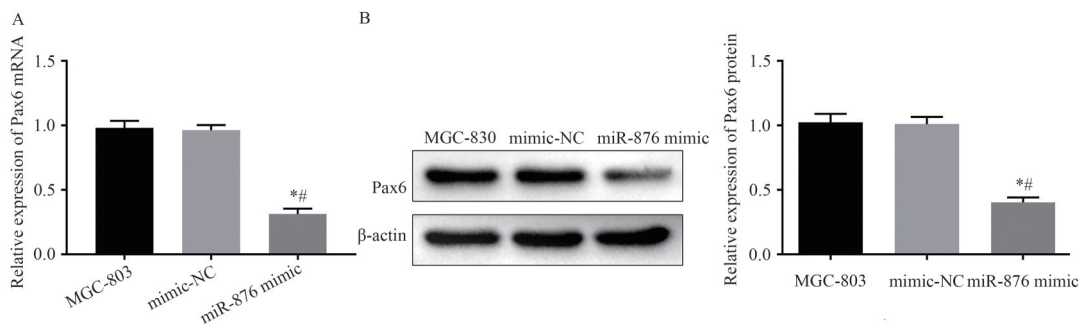
图 6 miR-876 靶向 Pax6

Fig. 6 miR-876 targets Pax6

mRNA 和蛋白表达水平显著低于 mimic-NC 组和对照组 ($P < 0.05$) (图 7)。

2.7 过表达 Pax6 回补 miR-876 的作用 与 miR-876 mimic 组比, miR-876 mimic+pcDNA-3.1-Pax6

组细胞增殖、迁移和侵袭能力均显著升高 ($P < 0.05$), 说明过表达 Pax6 可逆转 miR-876 对细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用 (图 8)。

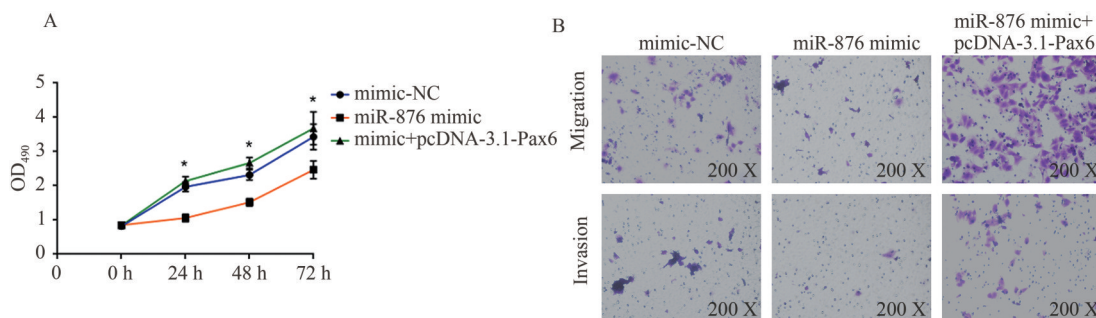


注: (A) MGC-803 细胞 Pax6 mRNA 表达水平; (B) MGC-803 细胞 Pax6 蛋白表达水平。与 MGC-803 相比, $^*P<0.05$; 与 mimic NC 相比, $^{##}P<0.05$ 。

Note: (A) The expression level of Pax6 mRNA in MGC-803 cells; (B) The expression level of Pax6 protein in MGC-803 cells. Compared with MGC-803 cells, $^*P<0.05$; Compared with mimic NC, $^{##}P<0.05$.

图 7 miR-876 对 Pax6 mRNA 和蛋白表达水平的影响

Fig. 7 Effects of miR-876 on Pax6 mRNA and protein expression levels



注: (A) 过表达 Pax6 对 MGC-803 细胞增殖的影响; (B) 过表达 Pax6 对 MGC-803 细胞迁移和侵袭的影响。与 miR-876 mimic 组相比, $^*P<0.05$ 。

Note: (A) Effects of Pax6 overexpression on the proliferation of MGC-803 cells; (B) Effects of Pax6 overexpression on the migration and invasion of MGC-803 cells. Compared with miR-876 mimic group, $^*P<0.05$.

图 8 过表达 Pax6 回补 miR-876 的作用

Fig. 8 Effects of Pax6 overexpression on miR-876

3 讨论

胃癌的发生发展和基因调控失调有明显关联^[8]。miRNA 是调控基因转录的重要因子,在胃癌的发生发展过程中起着非常重要的作用^[9]。miRNA 在血清/血浆等体液、组织、代谢物中性质高度稳定,冷冻样品中的 miRNA 也难以被 RNA 酶降解,采用 RT-qPCR 即可对其进行检测^[10]。研究胃癌相关 miRNA 及其靶基因,以发现其在胃癌发生发展中的作用,对于制定行之有效的治疗方案具有至关重要的意义。miR-876 是 miRNA 的一种,目前研究发现,其在肝细胞癌组织以及细胞系中表达下调^[4]。细胞转染实验研究发现,过表达 miR-876 可以显著抑制肝癌细胞的恶性增殖、侵袭和迁移^[5]。Bao 等^[6]研究发现,肺癌患者的癌组织及癌细胞中 miR-876 表达水平降低。Liu 等^[11]研究发现,上调 miR-876 表达可以显著降低舌鳞状细胞癌的侵袭能力。另有研究发现,miR-876 可靶向作用于核转运蛋白 4

(karyopherin alpha 4, KPNA4),从而降低宫颈癌细胞的增殖、迁移以及侵袭能力^[12-13]。因此,过表达 miR-876 在抑制恶性肿瘤的发展中发挥了重要作用,但目前,miR-876 在胃癌中的作用研究还比较少。Pax6 基因表达异常和恶性肿瘤的发生发展具有密切关系,但在不同恶性肿瘤中发挥的调控作用不同。研究发现,Pax6 在肺癌、乳腺癌、胰腺癌中表达上调,发挥促癌作用,而在胃癌中表达下调,发挥抑癌作用^[14-17]。本研究发现,胃癌组织中 miR-876 的表达水平显著低于癌旁组织,而 Pax6 mRNA 和蛋白表达水平均显著高于癌旁组织,且 miR-876 与 Pax6 mRNA 的表达水平呈负相关。此外,miR-876 低表达与胃癌患者的 TNM 分期、淋巴结转移有关。因此,本研究进一步从细胞实验角度对 miR-876 与 Pax6 以及胃癌细胞增殖、侵袭、迁移的关系进行了探讨。

本研究采用 RT-qPCR 检测胃上皮细胞 GES-1 以及胃癌细胞 MGC-803、BGC-823、SGC-7901 中的

miR-876 表达水平,结果发现,miR-876 在胃癌细胞系 MGC-803、BGC-823、SGC-7901 中均呈低表达,证实胃癌组织及胃癌细胞系中 miR-876 呈低表达。本研究建立了转染模型 miR-876 mimic,发现胃癌细胞 MGC-803 中 miR-876 表达水平显著升高,细胞增殖能力减弱,迁移和侵袭能力均受到抑制,miR-876 高表达对胃癌细胞具有抑制作用。本研究确定了 Pax6 是胃癌细胞中 miR-876 的靶基因,TargetScan 网站预测到 miR-876 与 Pax6 存在结合位点,双荧光素酶实验证实野生型 Pax6 的 miR-876 mimic 组荧光素酶活性显著低于 mimic NC 组,而突变型 Pax6 的 miR-876 mimic 组荧光素酶活性与 mimic-NC 组无显著差异。RT-qPCR 和 Western blotting 结果显示,miR-876 mimic 组 Pax6 mRNA 和蛋白表达水平均显著低于 mimic-NC 组和对照组。与 miR-876 mimic 组比,miR-876 mimic+pcDNA-3.1-Pax6 组细胞增殖、迁移和侵袭能力均显著增强,说明过表达 Pax6 可逆转 miR-876 对细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。

综上所述,miR-876 靶向 Pax6 可显著抑制胃癌细胞 MGC-803 的增殖、侵袭和迁移能力。未来通过调控 miR-876/Pax6 可能研发出针对胃癌患者的个体化 miRNA 靶向治疗方案。Pax6 有望成为新的胃癌治疗靶点,从而提高胃癌患者的生存质量以及生存率。

参考文献

- [1] QUACH D T, HIYAMA T, LE H M, et al. Use of endoscopic assessment of gastric atrophy for gastric cancer risk stratification to reduce the need for gastric mapping [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2020, 55(4): 402-407. DOI: 10.1080/00365521.2020.1740777.
- [2] ROVIELLO G, CONCA R, D'ANGELO A, et al. Association between neutropenia and response to ramucirumab and paclitaxel in patients with metastatic gastric cancer [J]. *Anti Cancer Drugs*, 2020, 31(6): 632-636. DOI: 10.1097/cad.0000000000000905.
- [3] O'NEILL C P, DWYER R M. Nanoparticle-based delivery of tumor suppressor microRNA for cancer therapy [J]. *Cells*, 2020, 9(2): 521. DOI: 10.3390/cells9020521.
- [4] WANG Y Z, XIE Y T, LI X F, et al. miR-876-5p acts as an inhibitor in hepatocellular carcinoma progression by targeting DNMT3A [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(7): 1024-1030. DOI: 10.1016/j.prp.2018.04.012.
- [5] XU Q R, ZHU Q J, ZHOU Z Y, et al. microRNA-876-5p inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting BCL6 corepressor like 1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 645-652. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.04.037.

- [6] BAO L, LV L, FENG J P, et al. miR-876-5p suppresses epithelial-mesenchymal transition of lung cancer by directly down-regulating bone morphogenetic protein 4 [J]. *J Biosci*, 2017, 42(4): 671-681. DOI: 10.1007/s12038-017-9722-5.
- [7] YANG Q, SHAO Y, SHI J, et al. Concomitant *PIK3CA* amplification and *RASSF1A* or *PAX6* hypermethylation predict worse survival in gastric cancer [J]. *Clin Biochem*, 2014, 47(1/2): 111-116. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.10.014.
- [8] 蒋丹丹, 陈茜, 赵海霖, 等. 沉默 NEUROG3 基因表达增强胃癌细胞恶性表型的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(10): 1008-1014. DOI: 10.16016/j.1000-5404.20191237.
- [9] PEREIRA J, SANTOS M, DELABIO R, et al. Analysis of gene expression of miRNA-106b-5p and *TRAIL* in the apoptosis pathway in gastric cancer [J]. *Genes*, 2020, 11(4): 393. DOI: 10.3390/genes11040393.
- [10] 赵小蕾, 陈应坚, 廖苑君, 等. 胃癌相关 mRNA 和 miRNA 融合网络构建及关键节点分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2020, 27(8): 612-618. DOI: 10.16073/j.cnki.cjpt.2020.08.05.
- [11] LIU X M, ZHANG B R, JIA Y, et al. SNHG17 enhances the malignant characteristics of tongue squamous cell carcinoma by acting as a competing endogenous RNA on microRNA-876 and thereby increasing specificity protein 1 expression [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(6): 711-725. DOI: 10.1080/15384101.2020.1727399.
- [12] YANG C G, REN J, LI B L, et al. Identification of clinical tumor stages related mRNAs and miRNAs in cervical squamous cell carcinoma [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(10): 1638-1647. DOI: 10.1016/j.prp.2018.07.035.
- [13] VARGHESE V K, SHUKLA V, KABEKKODU S P, et al. DNA methylation regulated microRNAs in human cervical cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(3): 370-382. DOI: 10.1002/mc.22761.
- [14] JIANG Q F, XING W Q, CHENG J H, et al. Knockdown of lncRNA XIST suppresses cell tumorigenicity in human non-small cell lung cancer by regulating miR-142-5p/PAX6 axis [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 4919-4929. DOI: 10.2147/ott.s238808.
- [15] ZHANG X H, LI B F, DING J, et al. lncRNA DANCR-miR-758-3p-PAX6 molecular network regulates apoptosis and autophagy of breast cancer cells [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 4073-4084. DOI: 10.2147/CMAR.S254069.
- [16] LITTLE E C, KUBIC J D, SALGIA R, et al. Canonical and alternative transcript expression of PAX6 and CXCR4 in pancreatic cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 4027-4034. DOI: 10.3892/ol.2017.5956.
- [17] 任佳琦, 袁宁璐, 闫冬, 等. PAX6 基因在肿瘤中的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2016, 36(7): 1026-1029. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2016.07.029.

收稿日期: 2020-09-10 校稿: 王娟 李征

本文引用格式: 宗静, 郑扬, 李启成, 等. miR-876 靶向 Pax6 抑制胃癌细胞增殖、侵袭和迁移[J]. *肿瘤药学*, 2022, 12(5): 592-598. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.05.06.

Cite this article as: ZONG Jing, ZHENG Yang, LI Qicheng, et al. miR-876 targeting Pax6 inhibits the proliferation, invasion and migration of gastric cancer cells [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2022, 12(5): 592-598. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.05.06.