

胃癌中 miR-148a 通过 DNMT1 调控 E-cadherin 的表达

过晓强,邓凯元,夏加增,姚路斌,王春明,梁正*

(南京医科大学附属无锡第二医院普外科,江苏 无锡 214002)

[摘要] 目的:研究胃癌中 miR-148a 与 E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达的相关性,并进一步探索 miR-148a 对 E-cadherin 的内在调控机制。方法:通过 qRT-PCR 或 Western blot 检测胃癌组织中 E-cadherin 及 miR-148a 的表达,使用 Pearson 相关分析检测 E-cadherin 与 miR-148a 表达的相关性;通过去甲基化药物处理,研究启动子异常甲基化与 E-cadherin 表达的关系;通过转染 miR-148a mimics 提高 miR-148a 的表达水平,转染 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)siRNA 干扰 DNMT1 的表达水平,进一步研究 miR-148a 对 E-cadherin 的调控机制。结果:与正常胃黏膜相比,E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达水平在胃癌组织中显著下调,并与 miR-148a 的表达呈正相关。去甲基化药物 5-aza-dC 处理后,胃癌细胞 MGC-803 及 SGC-7901 中 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达水平显著上升。胃癌细胞转染 miR-148a mimics 后,E-cadherin 的蛋白表达水平明显提高,并且干扰 DNMT1 的表达后,E-cadherin 的蛋白表达水平也显著上调。结论:miR-148a 能通过 DNMT1 进一步调控 E-cadherin 的表达。

[关键词] 胃癌;DNA 甲基化转移酶 1;miR-148a;E-cadherin

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)04-470-04

doi:10.7655/NYDXBNS20150406

miR-148a modulates E-cadherin in gastric cancer by targeting DNA methyltransferase

Guo Xiaoqiang, Deng Kaiyuan, Xia Jiazeng, Yao Lubing, Wang Chunming, Liang Zheng*

(Department of Surgery, Wuxi Second Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation between E-cadherin and miR-148a, and explore the underlying mechanism of miR-148a regulating E-cadherin expression in gastric cancer. **Methods:** The mRNA levels of E-cadherin and miR-148a were detected by qRT-PCR, and protein expression of E-cadherin was assayed by Western blot; A correlation between E-cadherin mRNA levels and that of miR-148a in gastric cancer was investigated by Pearson correlation analyses; The relationship between aberrant methylation and E-cadherin expression was evaluated by treatment of gastric cancer cells with demethylation drug; The regulatory mechanism of miR-148a modulating E-cadherin was analyzed by transfection of gastric cancer cells with miR-148a mimics or DNA methyltransferase 1 (DNMT1) siRNA. **Results:** The mRNA and protein levels of E-cadherin were significantly downregulated in gastric cancer tissues compared with corresponding normal tissues, and were positively correlated with miR-148a expression. After treatment of MGC-803 and SGC-7901 cells with 5-aza-dC, a significant increase in E-cadherin mRNA and protein levels was observed. Moreover, overexpression of miR-148a, which had been verified to modulate DNMT1 expression, could reactivate the expression of E-cadherin. Knockdown of DNMT1 by DNMT1 siRNA could also increase the mRNA and protein levels of E-cadherin. **Conclusion:** The enforced expression of miR-148a may contribute to the reactivation of E-cadherin by suppression of DNMT1.

[Key words] gastric cancer; DNMT1; miR-148a; E-cadherin

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04):470-473]

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,据世界卫生组织估计,2012 年全球胃癌的发病率和病死率

在所有肿瘤中分别位列第 5 和第 3 位。近些年来,临床诊断及治疗上的进展大大改善了早期胃癌的预后,然而进展期胃癌的 5 年生存率仍无明显提高。因此,更深入地了解胃癌的发生发展机制和探索新的诊断指标及治疗靶点具有重大的临床意义。

[基金项目] 江苏省卫生厅科研立项(H201347);无锡市医管中心联合攻关项目(YGZX1317)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:lz112212344@163.com

microRNAs (miRNAs) 是一类高度保守的内源

性单链非编码小 RNA,它们通过与靶基因的 3'非编码区完全或不完全互补结合调节靶基因的表达。近年来,研究发现 miRNAs 在各种肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用,它们通过靶向调节某些致癌或抑癌基因的表达而影响肿瘤的增殖、凋亡、转移和侵袭等^[1]。胃癌中,一些 miRNAs 已经被证实表达失调,并且与胃癌的发生和发展密切相关^[2-3]。其中, microRNA-148a(miR-148a) 在胃癌组织中表达显著下调,并能抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[4]。

基因启动子区域的异常甲基化是基因表达沉默的重要机制,并与肿瘤的生成密切相关^[5]。抑癌基因 CDH1 编码的 E-钙黏蛋白(E-cadherin)是一种经典的黏附连接蛋白,其表达缺失能导致肿瘤细胞的转移侵袭能力增强。胃癌中,E-cadherin 被证实其表达显著下调,并与其基因启动子区的异常超甲基化密切相关^[6]。

有研究表明,miR-148a 能通过上调 E-cadherin 的表达从而抑制胃癌的转移,然而 miR-148a 调控 E-cadherin 的内在机制仍不清楚^[7]。本研究将验证胃癌中 miR-148a 与 E-cadherin 的相关性,并进一步探索 miR-148a 调控 E-cadherin 的内在机制。

1 对象和方法

1.1 对象

胃癌组织及其对应的正常胃黏膜组织(距癌灶边缘 5 cm 以上)取自 2014 年 1~5 月期间在南京医科大学附属无锡第二医院普外科接受 D2 胃癌根治术治疗的 20 例原发性胃癌患者,术前均未接受放疗或化疗等抗肿瘤治疗。该实验获得南京医科大学伦理委员会批准,手术前与每位胃癌患者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养

胃癌细胞系(MGC-803、SGC-7901,中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心)。SGC-7901 用 RPMI-1640 培养基培养,MGC-803 用 DMEM 高糖培养基培养。所有细胞培养于含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱。

1.2.2 荧光定量 PCR

组织和细胞中的总 RNA 通过 TRIzol (Invitrogen 公司,美国)提取,并用 TaKaRa Prime Script RT Master Mix Kit 试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA。E-cadherin 的引物为:上游 5'-CAGCACGTACACAGCCCTAA-3';下游 5'-ACCTGAGGCTTTGGATTCCCT-3'^[8]。

通过 SYBR Green PCR Kit 试剂盒(Qiagen 公司,德国)进行荧光定量,反应条件如下:95℃ 5 min;95℃ 10 s,60℃ 30 s,循环 40 个周期,以 β -actin 作为内参。使用 All-in-One™ miRNA qPCR Primer 试剂盒检测 miR-148a 的表达,SYBR Green PCR Kit 试剂盒(Qiagen 公司,德国)进行荧光定量,反应条件如下:95℃ 10 min;95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 30 s,循环 35 个周期,以 U6 作为内参。用 $\Delta\Delta C_T$ 值来表示 miR-148a 或 E-cadherin 在胃癌组织中的相对表达量, $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ 肿瘤组织}} - \Delta C_{T \text{ 正常组织}}$, $\Delta C_T = C_{\text{miRNA}} - C_{\text{U6}}$ 或 $C_{\text{E-cadherin}} - C_{\beta\text{-actin}}$ 。

1.2.3 细胞转染

miR-148a mimics(广州瑞博公司),DNA 甲基化转移酶 1(DNMT1) siRNA(苏州吉玛公司)。细胞种植于 6 孔板中,24 h 后用 lipofectamine 2000 将 miR-148a mimics 或 DNMT1 siRNA 及对照转染至细胞中,转染 48 h 后收获细胞。

1.2.4 Western blot

细胞总蛋白通过蛋白裂解液提取,每个泳道上样 10 μ g 蛋白,通过电泳分离蛋白,并转至 PVDF 膜上,用 5%的脱脂奶粉封闭 1 h。DNMT1 一抗(sc-271729,Santa Cruz 公司,美国)或 E-cadherin 一抗(sc-7870,Santa Cruz 公司,美国)4℃ 孵育过夜,二抗孵育 1 h,并通过 ECL 显色。以 β -actin 作为内参。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS18.0 统计软件。两两比较采用成组设计定量资料 *t* 检验,胃癌组织中 E-cadherin 和 miR-148a 的表达相关性采用 Pearson 相关性分析。 $P \leq 0.05$ 认为有统计学差异,所有实验至少重复 3 次。

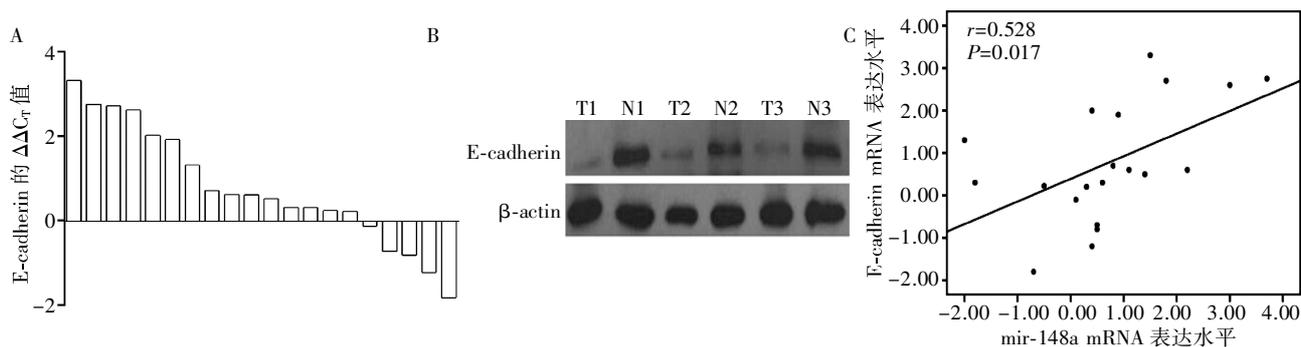
2 结果

2.1 胃癌组织中 miR-148a 与 E-cadherin 的表达呈正相关

qRT-PCR 检测结果显示,75%(15/20)的胃癌组织中 E-cadherin 的表达较正常胃黏膜组织低(图 1A、B)。另外,miR-148a 及 E-cadherin mRNA 表达的直线相关分析结果显示两者表达呈显著的正相关(图 1C)。

2.2 miR-148a 过表达上调 E-cadherin 的表达

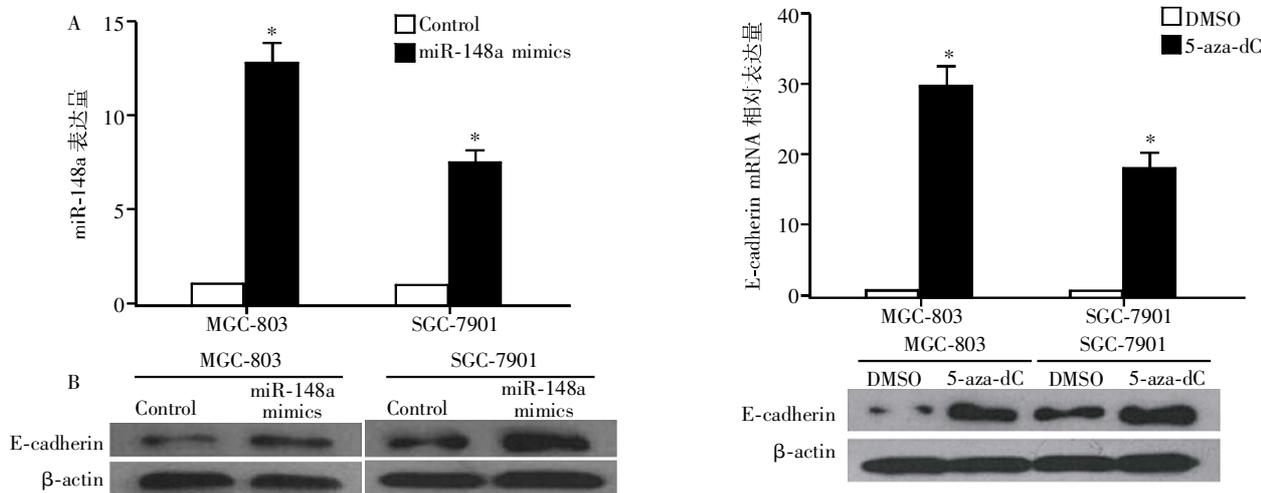
miR-148a mimics 转染入胃癌细胞系,通过 qRT-PCR 检测 miR-148a 的表达,结果显示 miR-148a 的表达显著升高(图 2A)。Western blot 检测细胞中 E-cadherin 的蛋白水平,结果显示 E-cadherin



A: 75% (15/20) 的胃癌组织中 E-cadherin 的表达较正常胃黏膜组织低; B: 相对于正常黏膜组织, 胃癌组织中 E-cadherin 的蛋白表达显著下降, T 为胃癌组织, N 为正常组织; C: E-cadherin 与 miR-148a 的 mRNA 水平呈正相关。

图 1 胃癌组织中 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达

Figure 1 mRNA and protein expressions of E-cadherin in gastric cancer tissues



A: 转染 miR-148a mimics 后, miR-148a mRNA 的表达显著上升; 与对照组相比, $*P < 0.01$; B: miR-148a 的过表达使 E-cadherin 的蛋白表达水平升高。

图 2 提高 miR-148a 的表达使 E-cadherin 表达升高

Figure 2 Overexpression of miR-148a increased the expression of E-cadherin

表达显著升高(图 2B)。

2.3 去甲基化药物能提高 E-cadherin 的表达

胃癌细胞系 MGC-803 及 SGC-7901 接受去甲基化药物 5-aza-dC 处理, 结果显示给药后两种胃癌细胞中 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达显著上升(图 3)。

2.4 干扰 DNMT1 导致 E-cadherin 表达上调

DNMT1 siRNA 转染入胃癌细胞, 并通过 qRT-PCR 及 Western blot 检测 DNMT1 及 E-cadherin 的表达水平。结果显示转染后 DNMT1 的表达明显降低(图 4A), 而 E-cadherin 的表达显著上调(图 4B)。

3 讨论

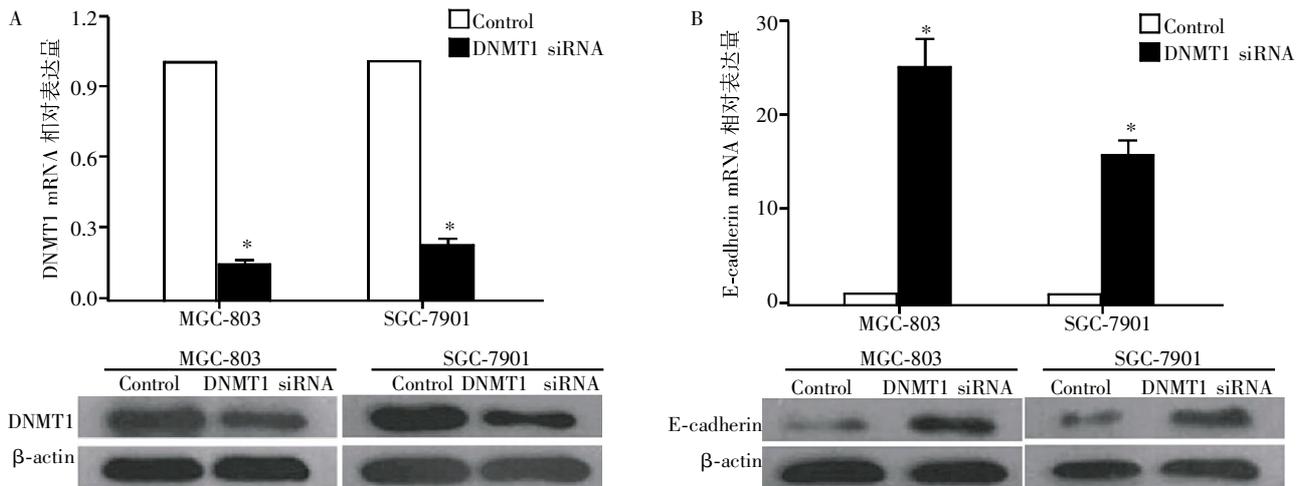
肿瘤细胞的转移和侵袭与恶性肿瘤的快速复发和不良预后有着密切关系。上皮-间质转化(ep-

与 DMSO 组相比, $*P < 0.01$ 。

图 3 5-aza-dC 给药处理后胃癌细胞 MGC-803 和 SGC-7901 中 E-cadherin mRNA 及蛋白表达水平显著提高

Figure 3 After treatment of MGC-803 and SGC-7901 cells with 5-aza-dC, the mRNA and protein levels of E-cadherin significantly increased

ithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 是指上皮细胞在特定的生理和病理条件下向间充质细胞转化的现象, 被看成导致癌症进展的重要病理过程。许多研究已经表明 EMT 在肿瘤细胞的迁移和侵袭过程中起着重要作用^[9]。E-cadherin 是一类介导上皮细胞间黏附维持组织结构完整性和极性的钙依赖性跨膜糖蛋白, 它的表达缺失是 EMT 的重要标志之一, 与肿瘤细胞的侵袭转移密切相关^[10]。在胃癌中, E-cadherin 的表达显著下降, 并与启动子的异常超甲基化密切相关^[6]。miRNAs 在肿瘤细胞的各种生物学进程中发挥着重要作用, 包括增殖、分化、凋亡等, 它们通过调控下游基因的表达发挥其致癌或抑癌作用^[11]。MiR-148a 在胃癌中发挥重要功能, 通过调控多种靶基因或通路影响胃癌细胞的增殖、转



A:通过 siRNA 干扰 DNMT1 的表达后, DNMT1 的 mRNA 和蛋白水平显著下降; B: DNMT1 表达下调后, E-cadherin 的 mRNA 及蛋白水平显著上升。与对照组相比, $*P < 0.01$ 。

图 4 干扰 DNMT1 的表达使 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白水平显著升高

Figure 4 E-cadherin mRNA and protein expressions increased after knockdown of DNMT1

移和侵袭^[4]。Wang 等^[7]发现 miR-148a 能通过上调 E-cadherin 的表达从而抑制胃癌的转移, 但 E-cadherin 不是 miR-148a 的直接靶点, 因此 miR-148a 如何调控 E-cadherin 的表达需要进一步的研究。

本研究中, 发现 miR-148a 和 E-cadherin 在胃癌组织中均频繁低表达, 并且它们 mRNA 的表达呈正相关, 提示它们之间可能存在调控关系。为了证实 miR-148a 是否对 E-cadherin 有调控作用, 转染 miR-148a mimics 入胃癌细胞 MGC-803 和 SGC-7901 提高其 miR-148a 表达水平, 结果显示 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达均显著上升, 表明 miR-148a 能够正向调控 E-cadherin 的表达。对胃癌细胞进行 5-aza-dC 给药处理, 发现胃癌细胞中 E-cadherin 的表达显著升高, 证实 E-cadherin 的低表达与其基因启动子区域的异常甲基化密切相关。本课题组前期研究发现 miR-148a 能靶向调控 DNMT1, 并进一步影响某些抑癌基因的启动子甲基化水平, 如 RUNX3 和 MEG3, 从而影响这些抑癌基因的表达^[12-14]。因此, 推测 miR-148a 可能通过调节 DNMT1 的表达进一步影响 E-cadherin 的甲基化水平, 从而调控 E-cadherin 的表达。为了验证这个假设, 通过转染 DNMT1 siRNA 下调胃癌细胞的 DNMT1 表达, 结果显示 E-cadherin 的表达显著上升。由此, 本文得出 miR-148a 通过下调 DNMT1 的表达从而上调 E-cadherin 的表达水平, 并进一步影响胃癌细胞的转移和侵袭能力。

miR-148a/DNMT1 通路能够影响许多甲基化敏感基因的表达, 包括 RUNX3、MEG3 和 E-cadherin。另外, miR-152、miR-200 家族等也被证实能靶向调

节 DNMT 家族的表达, 从而影响许多基因的甲基化水平。这些 miRNAs/DNMTs 调控网络在胃癌的发生发展过程中发挥着重要的作用^[15-16]。在未来的研究中, 将更加深入地研究这些调控网络, 进一步探索胃癌的发生发展机制。

[参考文献]

- [1] Iorio MV, Croce CM. microRNA involvement in human cancer[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(6):1126-1133
- [2] Zhou X, Xu G, Yin C, et al. Down-regulation of miR-203 induced by *Helicobacter pylori* infection promotes the proliferation and invasion of gastric cancer by targeting CASK[J]. Oncotarget, 2014, 5(22):11631-11640
- [3] Shen J, Niu W, Zhou M, et al. MicroRNA-410 suppresses migration and invasion by targeting MDM2 in gastric cancer[J]. PLoS ONE, 2014, 9(8):e104510
- [4] Xia J, Guo X, Yan J, et al. The role of miR-148a in gastric cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2014, 140(9):1451-1456
- [5] Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond[J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(7):484-492
- [6] 李晓军, 赵阳, 任宏. 遗传性和散发性胃癌上皮型钙黏附素的表达和启动子甲基化状态的关系[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(1):125-127
- [7] Wang SH, Li X, Zhou LS, et al. microRNA-148a suppresses human gastric cancer cell metastasis by reversing epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Tumour Biol, 2013, 34(6):3705-3712
- [8] Zhang JP, Zeng C, Xu L, et al. MicroRNA-148a suppresses the epithelial-mesenchymal transition and metastasis of

- hepatoma cells by targeting Met/Snail signaling [J]. *Oncogene*, 2014, 33(31):4069-4076
- [9] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6):442-454
- [10] van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(23):3756-3788
- [11] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2):215-233
- [12] Zuo J, Xia J, Ju F, et al. MicroRNA-148a can regulate runt-related transcription factor 3 gene expression via modulation of DNA methyltransferase 1 in gastric cancer [J]. *Mol Cells*, 2013, 35(4):313-319
- [13] Yan J, Guo X, Xia J, et al. MiR-148a regulates MEG3 in gastric cancer by targeting DNA methyltransferase 1 [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(3):879
- [14] Zhu A, Xia J, Zuo J, et al. MicroRNA-148a is silenced by hypermethylation and interacts with DNA methyltransferase 1 in gastric cancer [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(4):2701-2709
- [15] Tang H, Deng M, Tang Y, et al. miR-200b and miR-200c as prognostic factors and mediators of gastric cancer cell progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(20):5602-5612
- [16] Wang YS, Chou WW, Chen KC, et al. MicroRNA-152 mediates DNMT1-regulated DNA methylation in the estrogen receptor alpha gene [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(1):e30635
- [收稿日期] 2014-11-19

(上接第 449 页)

- 2014, 61(4):903-911
- [9] Potthoff MJ, Inagaki T, Satapati S, et al. FGF21 induces PGC-1 and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(26):10853-10858
- [10] Beyolu D, Idle JR. The metabolomic window into hepatobiliary disease [J]. *J Hepatol*, 2013, 59(4):842-858
- [11] Cree MG, Zwetsloot JJ, Herndon DN, et al. Insulin sensitivity is related to fat oxidation and protein kinase C activity in children with acute burn injury [J]. *J Burn Care Res*, 2008, 29(4):585-594
- [12] Felser A, Stoller A, Morand R. Hepatic toxicity of dronedarone in mice; Role of mitochondrial β -oxidation [J]. *Toxicology*, 2014, 323(20):1-9
- [13] Snawder JE, Roe AL, Benson RW. Loss of CYP2E1 and CYP1A2 activity as a function of acetaminophen dose: relation to toxicity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 203(6):532-539
- [14] Stepp MW, Folz RJ, Yu J, et al. The c10orf10 gene product is a new link between oxidative stress and autophagy [J]. *BBA*, 2014, 1843(8):1076-1088
- [15] Vilà-Brau A, De Sousa-Coelho AL, Mayordomo C, et al. Human HMGCS2 regulates mitochondrial fatty acid oxidation and FGF21 expression in HepG2 cell line [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(23):20423-20430
- [收稿日期] 2014-12-04