·肿瘤机理·

DOI:10.16605/j.cnki.1007-7847.2020.03.0145

miR-365 通过靶向 FoxO1 抑制胃癌细胞的增殖

陈 路[1], 胡 爽[2], 张慧敏[3], 王 君[3], 黄 凤[3], 王志文[1*]

(1. 岳阳职业技术学院 慢性病重点实验室, 中国湖南 岳阳 414000; 2. 湖南师范大学附属岳阳医院/岳阳市二人民医院, 中国湖南 岳阳 414000; 3. 武汉科技大学 生命科学与健康学院, 中国湖北 武汉 430065)

摘 要: 为了探究 miR-365 对胃癌细胞活力、增殖的影响及作用机制, 使用 RT-qPCR 技术检测胃癌细胞(AGS 和 MGC80-3)与正常胃上皮细胞(GES-1)中 miR-365 的内源性表达水平及临床样本中胃癌组织和癌旁组织中 miR-365 的内源性表达水平; 使用 CCK-8 检测细胞增殖活力; 使用 RT-qPCR 及 Western-blot 检测周期蛋白依赖性激酶 4 (cyclin-dependent kinase 4, CDK4)、CDK6、周期蛋白 D1 (cyclinD1)和 FoxO1 的 mRNA 及蛋白质水平; 采用荧光素酶报告实验验证 miR-365 与 *FoxO1* 3′-UTR 的结合能力。实验结果显示, 与正常胃上皮细胞相比, 两种胃癌细胞内 miR-365 的表达下调; 转染 miR-365 模拟物后, 胃癌细胞的增殖活力下降, cyclinD1、CDK4、CDK6 及 FoxO1 的 mRNA 和蛋白质水平均下调; miR-365 可结合 *FoxO1* 的 3′-UTR, 进而抑制 FoxO1 蛋白的表达; 与癌旁组织比较, 癌组织中 miR-365 的表达降低。以上结果表明, miR-365 可通过靶向结合 *FoxO1* 的 3′-UTR 抑制 FoxO1 蛋白表达, 进而抑制胃癌细胞的增殖。

关键词: miR-365; 胃癌; 细胞增殖; FoxO1 蛋白; 细胞周期相关蛋白质

中图分类号: Q25, R735.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1007-7847(2021)02-0109-08

miR-365 Inhibits Gastric Cancer Cell Proliferation by Targeting FoxO1

CHEN Lu[1], HU Shuang[2], ZHANG Hui-min[3], WANG Jun[3], HUANG Feng[3], WANG Zhi-wen[1*]

(1. *Yueyang Key Laboratory of Chronic Noncommunicable Diseases*, *Yueyang Vocational & Technical College*, *Yueyang* 414000, *Hunan*, *China*; 2. *Yueyang Hospital Affiliated to Hunan Normal University/Yueyang Second People's Hospital*, *Yueyang* 414000, *Hunan*, *China*; 3. *College of Life Science and Health*, *Wuhan University of Science and Technology*, *Wuhan* 430065, *Hubei*, *China*)

Abstract: In order to explore the effect of miR-365 on the viability and proliferation of gastric cancer cells and its mechanism of action, RT-qPCR technology was used to detect the endogenous expression levels of miR-365 in gastric cancer cells (AGS and MGC80-3) and normal gastric epithelial cells (GES-1). At the same time, the endogenous expression levels of miR-365 in gastric cancer and adjacent tissues in clinical samples were detected. CCK-8 was used to detect cell proliferation, RT-qPCR and Western-blot were used to detect the mRNA and protein levels of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), CDK6, cyclinD1 and FoxO1, and the luciferase reporter experiment was used to verify the binding ability of miR-365 and *FoxO1* 3′-UTR. The experimental results showed that, compared with normal gastric epithelial cells, the two gastric cancer cells showed down-regulated expression of miR-365. After miR-365 mimics were transfected, the proliferation activity of gastric cancer cells was decreased, and the mRNA and protein levels of cyclinD1, CDK4, CDK6 and FoxO1 were down-regulated. miR-365 could bind to the 3′-UTR of *FoxO1*, inhibiting the expression of

收稿日期: 2020-03-27; **修回日期**: 2020-11-03

基金项目: 湖南省自然科学基金科教联合项目(2020JJ707); 岳阳市社科联基金项目(岳社科 2019x93)

作者简介: 陈路(1979—), 女, 湖南祁东人, 副教授; * 通信作者: 王志文(1980—), 男, 湖南祁阳人, 讲师, 主治医师, 主要从事肿瘤分子流行病学研究, Tel: 0730-8677501, E-mail: wzw189189@163.com。

FoxO1 protein. Compared with adjacent tissues, cancer tissues showed reduced expression of miR-365. The above results indicate that miR-365 could inhibit FoxO1 protein expression by targeting the 3′-UTR of *FoxO1*, thereby inhibiting the proliferation of gastric cancer cells.

Key words: miR-365; gastric cancer; cell proliferation; FoxO1; cell cycle related proteins

(*Life Science Research*, 2021, 25(2): 109~116)

胃癌(gastric cancer, GC)是世界范围内常见的恶性肿瘤, 其预后较差, 严重威胁人类健康。2018 全球癌症统计报告显示, 全球胃癌新增病例约 103 万例, 死亡约 728 685 例, 胃癌在恶性肿瘤中的发病率居第 5 位, 死亡率居第 3 位[1]。我国胃癌患者数量庞大, 每年新发病例占全球新发病例的 40%以上[2]。目前, 单纯原发癌的胃切除仍是胃癌治疗的首选方法, 但整体效果仍不理想[3-4], 故早期发现和治疗以及阻断或延缓胃癌恶性进展是改善胃癌预后的必要条件[5]。

微 RNA (microRNA, miRNA)是一类小的非编码 RNA, 通过与靶基因 mRNA 的 3′非翻译区(3′-untranslated region, 3′-UTR)碱基配对来调控 30%以上的哺乳动物基因[6-8]。以往的研究表明, 异常的 miRNA 表达与肿瘤的发生和发展密切相关, 特别是在胃癌中[4, 9~11]。一些在胃癌中表达发生改变的 miRNA 已经被证实可以控制胃癌细胞的增殖、凋亡和炎症[12~13]。有报道表明, miR-365 在胃癌中可作为抑癌基因参与调控胃癌的发生[14]。我们的研究发现, miR-365 在胃癌细胞系(AGS)内的表达水平低于正常胃上皮细胞(GES-1), 但其对胃癌细胞的具体调控机制和方式尚未阐明, 本文旨在进一步研究 miR-365 在胃癌细胞中参与调控胃癌发生的机制。

叉头盒蛋白(forkhead box protein)是一类转录因子, 主要存在于无脊椎动物和哺乳动物细胞内, 拥有一个高度保守的大于 100 个氨基酸的 DNA 结合域。该蛋白质的编码基因被分为 19 小类, 分别命名为 *Fox A*~*S*[15]。叉头转录因子 O 家族(FoxO)是叉头盒家族中最大的亚家族之一, 迄今已在哺乳动物中鉴定出 4 个 FoxO 亚型(FoxO1、FoxO3a、FoxO4、FoxO6), 它们都有序列相同的线虫同源基因[16]。在这些蛋白质中, FoxO1 被广泛研究, 是具有复杂活性的超转录因子。FoxO1 调节许多靶标, 包括凋亡和自噬相关的基因、抗氧化酶、细胞周期阻滞基因以及代谢和免疫调节剂[17~18]。目前普遍认为 FoxO1 蛋白是一种细胞周期抑制因子。然而, FoxO1 蛋白在胃癌发生过程中的作用尚不明确[19]。

本文在分子和细胞水平探究了 miR-365 在胃癌中对细胞增殖的影响, 可为阐明 miR-365 调控 FoxO1 的确切分子机制, 揭示 miR-365 调节 FoxO1 进而调控胃癌细胞增殖的机制研究提供基础理论依据, 同时也可为胃癌的治疗及预后干预和新的药物靶点研发提供基础支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

人胃腺癌细胞 AGS、MGC80-3 和人正常胃上皮细胞 GES-1 购自美国典型培养物保藏中心(ATCC), 分别在加有 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1%青-链霉素的 D-MEM/F-12 培养基、RPMI 1640 培养基和 DMEM 培养基(均购自美国 Gibco 公司)中培养。pmirGLO 载体源自美国 Addgene 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白酶、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)、ECL 发光液、细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK-8) (大连美伦生物技术有限公司); 抗 cyclinD1、CDK4、CDK6、FoxO1 抗体(CST 公司, 美国); anti-GAPDH (Santa Cruz 公司, 美国); 兔/鼠二抗(Thermo 公司, 美国); 荧光素酶报告实验所需试剂盒(Promega 公司, 美国); miR-365 模拟物(miR-365 mimics)、模拟物对照(negative control, NC)、反转录试剂盒(广州市锐博生物科技有限公司); RNA 提取试剂盒 Ultrapure RNA Kit (康为世纪生物科技有限公司); BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液(强)、脱脂奶粉(碧云天生物技术有限公司); 限制性核酸内切酶 *Sal* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ、T4 连接酶(NEB 公司); 突变试剂盒 Mut Express MultiS Fast Mutagenesis Kit V2、PCR 扩增酶 2× Rapid Taq Master Mix、转染试剂 ExFect® 2000 Transfection Reagent (南京诺唯赞医疗科技有限公司); miRNA 提取试剂盒 miRNeasy Mini Kit (QIAGEN 公司, 德国)。多功能酶标仪(Thermo 公司, 美国); 化学发光成像系统(Bio-Rad 公司, 美国)。

1.2　方法

1.2.1　质粒构建

以人基因组为模板扩增得到 *FoxO*1 3′-UTR 序列, 将所得片段连接到 pmirGLO 载体上得到野生型荧光素酶报告质粒 WT-pmirGLO-FoxO1。严格按照 Mut Express MultiS Fast Mutagenesis Kit V2 试剂盒说明书, 以 WT-pmirGLO-FoxO1 质粒为模板构建 *FoxO*1 3′-UTR 与 miR-365 结合位点突变的荧光素酶报告质粒 mut-pmirGLO-FoxO1, 所需 PCR 引物(表 1)在 Primer Premier 5.0 软件上设计, 所得序列由上海擎科生物科技有限公司合成。

1.2.2　细胞转染

在两支 1.5 mL 无菌离心管中各加入 25 μL无血清培养基, 然后一支添加适量的 ExFect 2000转染试剂(1 μg 目的质粒对应 2 μL ExFect 2000), 一支添加适量的目的质粒, 混匀。室温静置 5 min 后将目的质粒-培养基混合物滴加到 ExFect 2000-培养基混合物中, 并用移液器轻轻混匀。室温静置 10 min 后将 ExFect 2000/目的质粒复合物滴加至含有 AGS 和 MGC80-3 细胞的培养基中, 轻轻晃动培养皿使复合物均匀分布。过夜培养 24~48 h 后收取细胞, 进行后续实验。

1.2.3　荧光素酶报告实验

将 AGS 以每孔 2×10^5 个细胞接种于 24 孔板(每组 3 个重复), 待细胞贴壁后转染, 转染 24 h 后收集细胞。将收集得到的细胞用 1× PBS 洗涤, 然后加入 100 μL 1× passive lysis buffer, 冰上裂解 30 min 后 12 000 r/min 离心收集上清。取 10 μL 上清, 加入 100 μL luciferase assay buffer 混匀后立刻用多功能酶标仪测荧光值并做记录, 该过程应避光处理。取相同体积上清液进行蛋白质定量, 将所得数据进行统计学分析。

1.2.4　细胞活性实验

AGS 和 MGC80-3 细胞分别转染终浓度为 1 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L 的 miR-365 mimics 和模拟物对照(NC), 转染 24 h 后制备细胞悬液并对细胞进行计数。按照每孔 5×10^3 个细胞将细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板(每组 6 个重复), 最终要求每孔细胞悬液的体积约 100 μL, 待细胞贴壁后每孔加入 10 μL CCK-8 增强型溶液, 在 37 ℃培养箱内孵育 1 h 后测定 570 nm 处的吸光度值($A_{570\ nm}$), 所得数据进行统计学分析。

1.2.5　miRNA/mRNA 提取及 RT-qPCR

细胞和病人组织样本的 miRNA 提取严格按照 miRNeasy Mini Kit 试剂盒中的说明书操作, mRNA 的提取工作严格按照 Ultrapure RNA Kit 试剂盒进行。对提取的 RNA 进行定量, 并将其按照反转录试剂盒说明书反转录成 cDNA。将得到的 cDNA 按照 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 10 μL、上游引物 0.8 μL、下游引物 0.8 μL、cDNA 2 μL、超纯水 6.4 μL 配成 20 μL PCR 扩增体系。扩增条件如下: 95 ℃预变性 10 min; 95 ℃变性 2 s、60 ℃退火 20 s、72 ℃延伸 10 s, 共 40 个循环。其中, miRNA 的 RT-qPCR 结果以 U6 为内参, mRNA 的 RT-qPCR 结果以 GAPDH 为内参。RT-qPCR 所需引物序列如表 2 所示, 均由上海擎科生物科技有限公司合成。

表 2　RT-qPCR 所需引物
Table 2　Primers used for RT-qPCR

Primer name	Primer sequence (5′ - 3′)	Size/bp
RT-miR-365-F	TAATGCCCCTAAAAATCCT	19
RT-miR-365-R	GAACATGTCTGCGTATCTC	19
RT-CDK4-F	ATGGCTACCTCTCGATATGAGC	22
RT-CDK4-R	CATTGGGGACTCTCACACTCT	21
RT-CDK6-F	GCTGACCAGCAGTACGAATG	20
RT-CDK6-R	GCACACATCAAACAACCTGACC	22
RT-FoxO1-F	TCGTCATAATCTGTCCCTACACA	23
RT-FoxO1-R	CGGCTTCGGCTCTTAGCAAA	20
RT-cyclinD1-F	GCTGCGAAGTGGAAACCATC	20
RT-cyclinD1-R	CCTCCTTCTGCACACATTTGAA	22
RT-U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA	17
RT-U6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT	20
RT-GAPDH-F	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	21
RT-GAPDH-R	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	23

1.2.6　Western-blot 分析

细胞经 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min 后在 4 ℃条件下 12 000 r/min 离心 15 min 取上清。采用

表 1　*FoxO*1 3′-UTR 报告质粒构建所需引物
Table 1　Primers used for *FoxO*1 3′-UTR plasmid construction

Primer name	Primer sequence (5′ - 3′)	Size/bp
WT-pmirGLO-FoxO1-3′-UTR-F	GGGTTAGTGAGCAGGTTACACTTAAAAGTACTTC	34
WT-pmirGLO-FoxO1-3′-UTR-R	TGGCTGACAAGACTTAACTCAAGTATTTAATA	32
mut-pmirGLO-FoxO1-3′-UTR-F	CGAACAGACCAACCTTTTGCCGCAGTTGGCCTCTCCTTGAGG	42
mut-pmirGLO-FoxO1-3′-UTR-R	AAGGAGAGGCCAACTGCGGCAAAAGGTTGGTCTGTTCGCATAAACCA	47

BCA 蛋白质定量试剂盒对目标蛋白质进行定量分析。取相同总量的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳; 根据目的蛋白的相对分子质量, 按照 200 mA 恒定电流、1 min/kD 将蛋白质转移到 PVDF 膜上; 转膜结束后将其用 5%的脱脂牛奶室温封闭 1 h。CyclinD1、CDK4、CDK6、FoxO1 一抗按照 1∶1 500 稀释使用, 4 ℃孵育过夜; TBST 洗涤 3 次(每次 10 min)后按照 1∶3 000 比例孵育兔/鼠二抗(根据一抗的种属来定), 常温孵育 1 h; TBST 洗涤 3 次(每次 10 min)后在化学发光成像系统中分析实验结果。

1.2.7 *数据处理*

数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 每个实验结果均进行 3 次独立重复实验。用 *t* 检验比较两组数据之间的差异, $P<0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-365 可抑制胃癌细胞的活力

为了探讨 miR-365 在胃癌细胞中的内源性表达水平, 我们分别提取了 GES-1、MGC80-3 和 AGS 中的总 miRNA, 检测了 3 种细胞系中 miR-365 的相对表达水平, 结果如图 1A 所示。与正常胃上皮细胞 GES-1 相比, 胃癌细胞 MGC80-3 和 AGS 中的 miR-365 水平明显下调。随后, 我们在胃癌细胞 MGC80-3 和 AGS 中转染不同浓度的miR-365 mimics 或 NC, 结果显示, 随着 miR-365 mimics 浓度的增加, 细胞的活力明显下降, 在 40 μmol/L 时 AGS 和 MGC80-3 的细胞活力与对照组相比分别下降 50%和 40% (图 1B)。以上结果表明, 在胃癌细胞中 miR-365 的表达量下调且 miR-365 可降低胃癌细胞的活力水平。

2.2 miR-365 通过抑制细胞周期蛋白抑制胃癌细胞增殖

为了探究 miR-365 是否通过参与调控胃癌细胞周期而影响细胞活力, 进而影响胃癌细胞的增殖, 我们对转染 miR-365 mimics (20 μmol/L)的 AGS 细胞进行了细胞周期相关蛋白质的转录和翻译水平检测。RT-qPCR 结果表明, AGS 细胞过表达 miR-365 mimics 后与对照组相比细胞周期相关蛋白质 CDK4、CDK6、cyclinD1 的 mRNA水平明显下调(图 2A); Western-blot 结果表明, CDK4、CDK6、cyclinD1 的蛋白质水平明显低于对照组(图2B)。由此我们得出, miR-365 mimics 可以抑制胃癌细胞周期蛋白的表达, 抑制胃癌细胞周期的进行, 降低胃癌细胞活力, 从而抑制胃癌细胞的增殖。

2.3 miR-365 通过靶向 *FoxO1* 3′-UTR 抑制 FoxO1 蛋白的表达

为了探讨 miR-365 抑制胃癌细胞增殖的分子机制, 我们在 TargetScanHuman 7.2 网站(http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_72/targetscan.cgi?species=Human&mir_sc=miR-365-3p)分析了 miR-365 的序列结构(图 3A), 发现 miR-365 可以靶向结合到 *FoxO1* 的 3′-UTR。为了探究 miR-365 是否确实可以与 *FoxO1* 的 3′-UTR 靶向结合, 我们构建了包含 *FoxO1* 3′-UTR 序列的野生型及

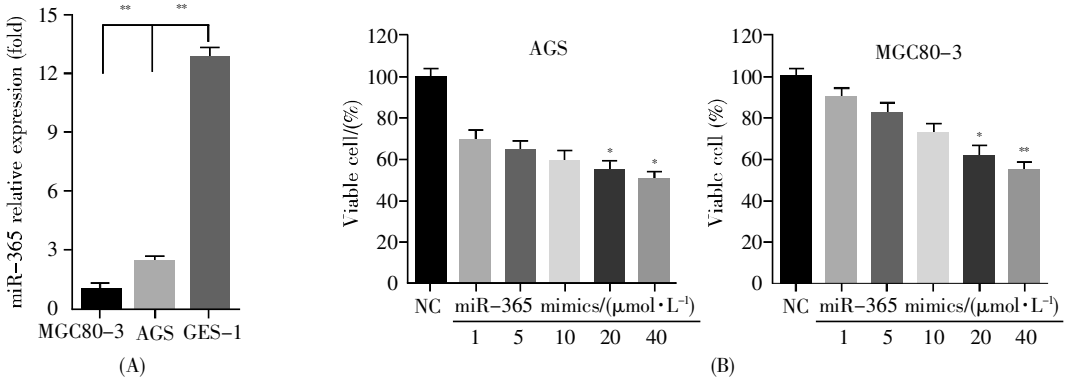


图 1 miR-365 在胃癌细胞系中的内源性表达及对胃癌细胞活力的影响

(A) RT-qPCR 检测 GES-1、MGC80-3 和 AGS 细胞系中 miR-365 的内源性表达; (B) 胃癌细胞 AGS 和 MGC80-3 转染不同量 miR-365 mimics 后经 CCK-8 检测细胞的活力。$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, 图 2~4 类似。

Fig.1 The endogenous expression of miR-365 in gastric cancer cell lines and its effect on the viability of gastric cancer cells

(A) RT-qPCR detection of miR-365 endogenous expression in GES-1, MGC80-3 and AGS cell lines; (B) Gastric cancer cells AGS and MGC80-3 were transfected with different amounts of miR-365 mimics and the cell viability was tested by CCK-8. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, these are same in the following figures.

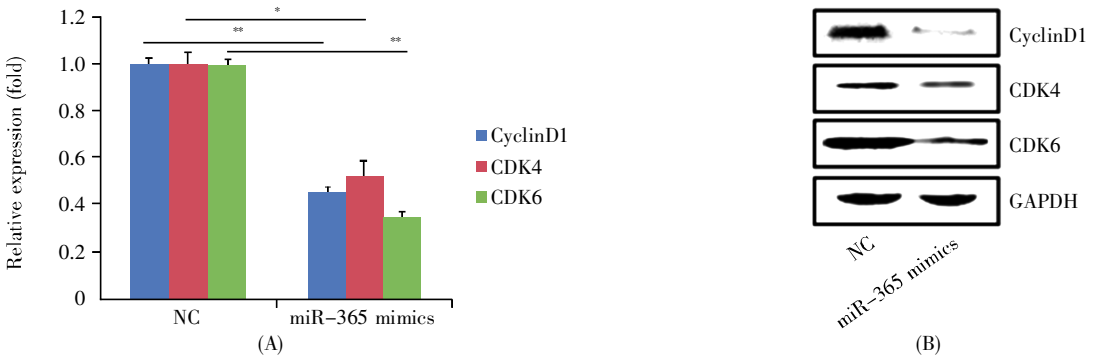


图 2　在 AGS 细胞中 miR-365 抑制细胞周期蛋白的表达

(A) RT-qPCR 方法检测 miR-365 对 CDK4、CDK6、cyclinD1 mRNA 水平的影响; (B) Western-blot 检测 CDK4、CDK6、cyclinD1 蛋白的表达。

Fig.2　Inhibition of cyclin transcription and expression by miR-365 in AGS cells

(A) Transfection of miR-365 mimics and control in AGS cells. RT-qPCR method was used to detect the effect of miR-365 on CDK4, CDK6 and cyclinD1 mRNA levels; (B) CDK4, CDK6 and cyclinD1 protein expression changes were detected by Western-blot.

突变型(miR-365 与 *FoxO1* 3′-UTR 的结合位点突变)荧光素酶报告质粒(图 3B, C), 并在 AGS 细胞中将野生型或突变型荧光素酶报告质粒与 miR-365 mimics (20 μmol/L)或 NC 共转染, 荧光素酶报告实验结果显示, 与对照组相比, miR-365 能显著抑制野生型荧光素酶报告基因活性, 但对突变型荧光素酶报告基因活性无明显影响(图 3D)。与该结果类似, 在转染 miR-365 mimics (20 μmol/L)或 NC 的 AGS 细胞中, Western-blot 结果表明, miR-365 可显著抑制 FoxO1 蛋白的表达(图 3E)。以上结果表明 miR-365 通过靶向 *FoxO1* 的 3′-UTR 抑制 FoxO1 蛋白的表达。

2.4　临床样本中 miR-365 在胃癌组织中下调

为了进一步确认 miR-365 对胃癌细胞增殖的抑制作用, 我们收集了 11 例临床胃癌样本及其对应的癌旁组织, 并用 RT-qPCR 检测了其miR-365 的表达。结果如图 4 所示, 相较于癌旁组织, miR-365 在癌组织中的表达明显下调, 证实 miR-365 抑制胃癌细胞增殖。

3　讨论

miRNA 表达失调已被证明会促进癌症的发展, 包括乳腺癌[20]、消化道癌症[21]、黑色素瘤[22]等。miR-365 位于染色体 16p13.12, 其表达模式和生物学作用与癌症类型相关。研究报道, miR-365 在皮肤鳞状细胞癌[23~24]中高表达, 而在乳腺癌[25]、结肠癌[26]、肺癌[27]和黑色素瘤[28]中下调, 提示 miR-365 可能在特定的癌症类型中发挥促增殖或促凋亡作用。目前, miR-365 在胃癌发展中的作用还知之甚少。已有的研究显示, miR-365-3p 通过调节 CDK4 和 CDK6 抑制皮肤鳞状细胞癌的进展[29], 同时, 其也可通过靶向 NRP (neuropilin)抑制恶性黑色素瘤的生长、增殖和转移[28]。另外, miR-365-3p 在乳腺癌中通过靶向 FOXK1 调节细胞增殖、迁移和侵袭[30]。我们的研究发现, miR-365 在胃癌细胞中表达下调, 并抑制胃癌细胞的活力。

FoxO 家族蛋白(包括 FoxO1、FoxO3a、FoxO4 和 FoxO6)已被越来越多的研究认为是重要的蛋白质家族, 可调节凋亡、细胞周期、自噬和 DNA 损伤修复等过程[31~32]。FoxO1 是在胰岛素反应性组织(例如肝脏)中表达得最丰富的同工型, 可以调节涉及凋亡、细胞周期、代谢、应激反应和分化的基因的表达[31~32]。许多研究关注其对细胞周期的调节作用。例如: PLK1 (polo-like kinase 1)与 FoxO1 相互作用, 使其磷酸化, 从而消除其对细胞生存的抑制作用, 促进 G2/M 周期进展[33]; 在增殖细胞中, FoxO1 可被 CDK1 激活, 从而影响 PLK 的表达[34]。根据这些发现, 大量的研究提出调控 FoxO1 可以应用于癌症治疗。敲除 *FoxO1* 可抑制三苯氧胺对乳腺癌细胞的敏感性[35]。核激活的 FoxO1 被报道可以控制骨肉瘤细胞中下游周期阻滞基因的表达, p21 和 p27 作为 FoxO1 的下游靶点, 可引起细胞周期停滞在 G1/S 边界, 从而抑制细胞增殖[36]。先前的研究报道, 姜黄素作为 FoxO1 激活剂, 可通过上调 p27 和 p21 以及下调 cyclinD1 来降低肺癌的增殖[37]。此外, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号转导途径和胰岛素信号转导途径可能参与了 FoxO1-p27 (kip)信号转导轴, 从而诱导细胞周期 G0/G1 阻滞[38]。我们的研究结果表明, miR-365 可通过靶向结合 *FoxO1* 的 3′-UTR 抑制 FoxO1 的表

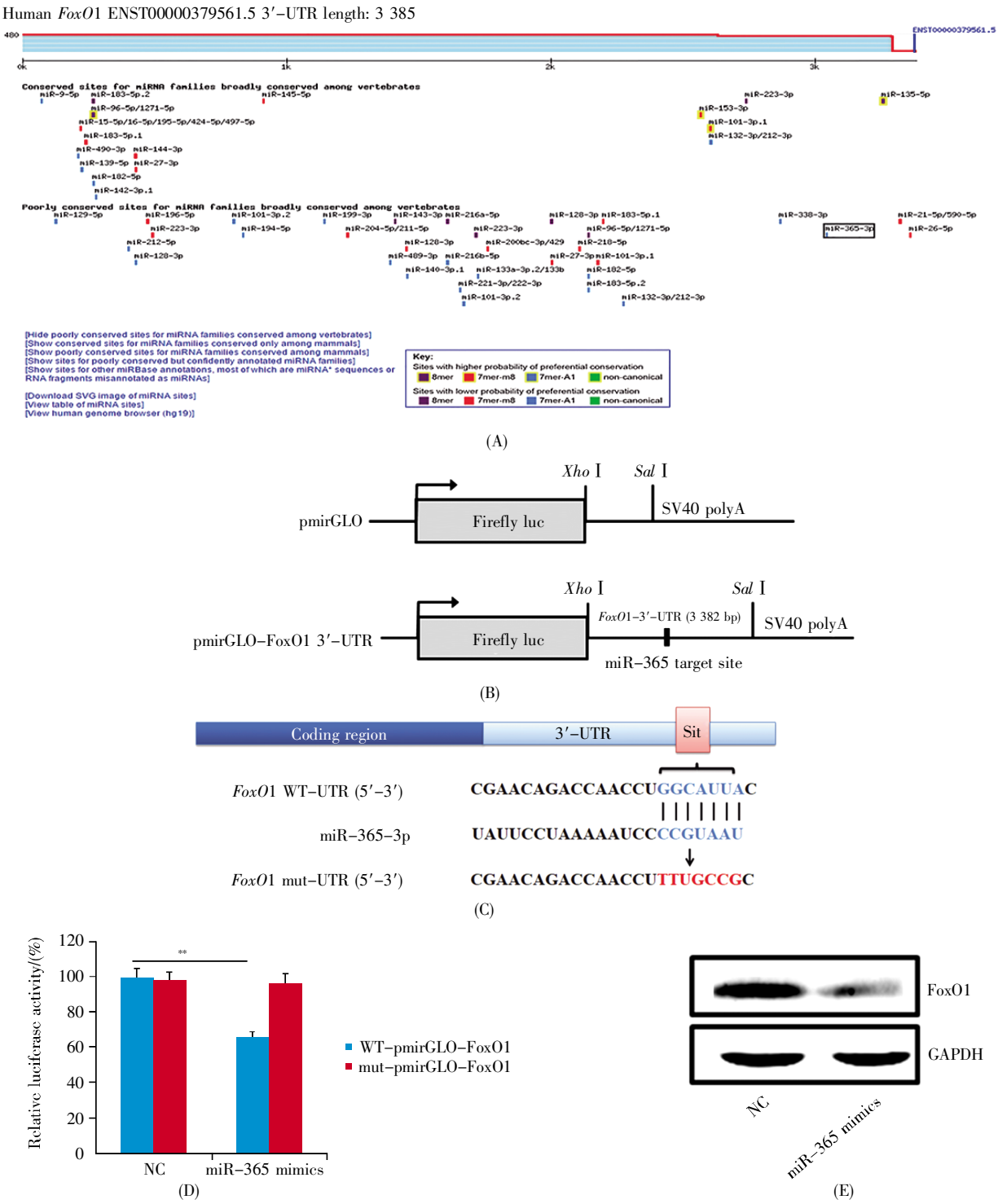


图 3 miR-365 通过靶向 *FoxO1* 的 3′-UTR 抑制 FoxO1 蛋白的表达

(A) 生物信息学分析预测 miR-365 可靶向结合 *FoxO1* 的 3′-UTR; (B) 荧光素酶报告质粒的结构示意图; (C) 突变型 *FoxO1* 3′-UTR 荧光素酶报告质粒构建及碱基突变示意图; (D) 在 AGS 细胞中将野生型或突变型荧光素酶报告质粒与 miR-365 mimics 或 NC 共转染, 采用荧光素酶报告实验检测荧光活性; (E) 在 AGS 细胞中转染 miR-365 mimics 或 NC, 采用 Western-blot 检测 FoxO1 蛋白表达水平。

Fig.3 Inhibition of FoxO1 protein expression by miR-365 targeting *FoxO1* 3′-UTR

(A) Prediction of miR-365 targeting 3′-UTR of *FoxO1* by bioinformatics analysis; (B) Schematic diagram of the luciferase reporter plasmid; (C) The construction of mutant *FoxO1* 3′-UTR luciferase reporter plasmid and schematic diagram of base mutation; (D) Co-transfection of AGS cells by wild-type or mutant luciferase reporter plasmid with miR-365 mimics or NC. The fluorescence activity was detected through luciferase reporter experiment; (E) The cells were transfected with miR-365 mimics or NC, and the expression level of FoxO1 protein was detected by Western-blot in AGS.

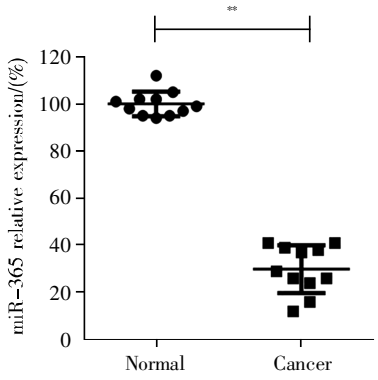


图 4　临床样本中 miR-365 的表达

RT-qPCR 检测病人癌组织及癌旁组织中 miR-365 的表达。

Fig.4　Expression of miR-365 in clinical samples

RT-qPCR detection of miR-365 expression in cancer and adjacent tissues.

达，进而影响胃癌细胞的增殖活力。

对于癌症的常规治疗，靶向细胞周期的化学疗法已经发展了数十年。细胞周期失调将导致细胞不受控制的增殖，同时允许细胞不受限制的复制和生长[39-40]。因此，靶向细胞周期并使得细胞复制受抑制可以阻止肿瘤形成[41]。在细胞周期运动中，细胞周期蛋白在触发和促进从 G1 期到 S 和 G2/M 期的细胞周期中起关键作用。据报道，cyclinD1 可能参与不同的周期状态[42]。通常，cyclinD1 或 G1/S 特异性 cyclinD1 通过结合并激活 CDK4、CDK6 的 G1 期特征来促进细胞增殖[43]。我们的研究表明，miR-365 通过抑制细胞周期蛋白抑制胃癌细胞增殖，推测 miR-365 可通过靶向结合 *FoxO1* 的 3′-UTR 抑制 FoxO1 的表达，进而调控胃癌细胞的增殖。

4　结论

本研究表明 miR-365 在胃癌细胞中表达下调，可视为一种抑癌因子。其通过靶向 *FoxO1* 的 3′-UTR 抑制 FoxO1 的表达，进而抑制细胞周期相关蛋白质 CDK4、CDK6 和 cyclinD1 的表达，抑制胃癌细胞的增殖和活力。这一研究结果进一步证实 FoxO1 可以参与胃癌细胞周期的进行，并提示 cyclinD1 可能是一个潜在的抗肿瘤靶点。

参考文献(References):

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.

[2] CHEN W, SUN K, ZHENG R, *et al*. Cancer incidence and mortality in China, 2014[J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2018, 30(1): 1-12.

[3] ZHAO X, LI X, YUAN H. microRNAs in gastric cancer invasion and metastasis[J]. Frontiers in Bioscience-Landmark, 2013, 18: 803-810.

[4] LIU G, JIANG C, LI D, *et al*. miRNA-34a inhibits EGFR-signaling-dependent MMP7 activation in gastric cancer[J]. Tumor Biology, 2014, 35(10): 9801-9806.

[5] LI N, ZHANG Q Y, ZOU J L, *et al*. miR-215 promotes malignant progression of gastric cancer by targeting RUNX1[J]. Oncotarget, 2016, 7(4): 4817-4828.

[6] DI LEVA G, CROCE C M. miRNA profiling of cancer[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2013, 23(1): 3-11.

[7] PEREIRA D M, RODRIGUES P M, BORRALHO P M, *et al*. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics[J]. Drug Discovery Today, 2012, 18(5/6): 282-289.

[8] SICARD F, GAYRAL M, LULKA H, *et al*. Targeting miR-21 for the therapy of pancreatic cancer[J]. Molecular Therapy, 2013, 21(5): 986-994.

[9] ZHOU X, XIA Y, SU J, *et al*. Down-regulation of miR-141 induced by helicobacter pylori promotes the invasion of gastric cancer by targeting STAT4[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2014, 33(4): 1003-1012.

[10] ZHOU X, YE F, YIN C, *et al*. The interaction between miR-141 and lncRNA-H19 in regulating cell proliferation and migration in gastric cancer[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015, 36(4): 1440-1452.

[11] JIANG Z C, TANG X M, ZHAO Y R, *et al*. A functional variant at miR-34a binding site in toll-like receptor 4 gene alters susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Chinese Han population[J]. Tumor Biology, 2013, 35(12): 12345-12352.

[12] SONG J H, MELTZER S J. MicroRNAs in pathogenesis, diagnosis, and treatment of gastroesophageal cancers[J]. Gastroenterology, 2012, 143(1): 35-47.e2.

[13] WU W K K, LEE C W, CHO C H, *et al*. MicroRNA dysregulation in gastric cancer: a new player enters the game[J]. Oncogene, 2010, 29(43): 5761-5771.

[14] GUO S L, YE H, TENG Y, *et al*. Akt-p53-miR-365-cyclin D1/cdc25A axis contributes to gastric tumorigenesis induced by PTEN deficiency[J]. Nature Communications, 2013, 4: 2544.

[15] JACKSON B C, CARPENTER C, NEBERT D W, *et al*. Update of human and mouse forkhead box (FOX) gene families[J]. Human Genomics, 2010, 4(5): 345-352.

[16] ZHOU L, YIN B, LIU Y, *et al*. Mechanism and function of decreased FOXO1 in renal cell carcinoma[J]. Journal of Surgical Oncology, 2012, 105(8): 841-847.

[17] MURTAZA G, KHAN A K, RASHID R, *et al*. FOXO transcriptional factors and long-term living[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, 2017: 3494289.

[18] WANG S, XIA P, HUANG G, *et al*. FoxO1-mediated autophagy is required for NK cell development and innate immunity[J]. Nature Communications, 2016, 7: 11023.

[19] GROSS D N, WAN M, BIRNBAUM M J. The role of FOXO in the regulation of metabolism[J]. Current Diabetes Reports, 2009, 9(3): 208–214.

[20] YU X, LI R, SHI W, *et al*. Silencing of microRNA–21 confers the sensitivity to tamoxifen and fulvestrant by enhancing autophagic cell death through inhibition of the PI3K–AKT–mTOR pathway in breast cancer cells[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 77: 37–44.

[21] SHEN H, XING C, CUI K, *et al*. MicroRNA–30a attenuates mutant KRAS–driven colorectal tumorigenesis via direct suppression of ME1[J]. Cell Death and Differentiation, 2017, 24(7): 1253–1262.

[22] VARAMO C, OCCELLI M, VIVENZA D, *et al*. MicroRNAs role as potential biomarkers and key regulators in melanoma[J]. Genes, Chromosomes & Cancer, 2017, 56(1): 3–10.

[23] ZHOU M, ZHOU L, ZHENG L, *et al*. miR–365 promotes cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC) through targeting nuclear factor I/B (NFIB)[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e100620.

[24] ZHOU M, LIU W, MA S, *et al*. A novel onco–miR–365 induces cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2013, 34 (7): 1653–1659.

[25] LIU F, ZHUANG L, WU R, *et al*. miR–365 inhibits cell invasion and migration of triple negative breast cancer through ADAM10[J]. Journal of B.U.ON, 2019, 24(5): 1905–1912.

[26] NIE J, LIU L, ZHENG W, *et al*. MicroRNA–365, down–regulated in colon cancer, inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis of colon cancer cells by probably targeting cyclin D1 and Bcl–2[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(1): 220–225.

[27] KANG S M, LEE H J, CHO J Y. MicroRNA–365 regulates NKX2–1, a key mediator of lung cancer[J]. Cancer Letters, 2013, 335(2): 487–494.

[28] BAI J, ZHANG Z, LI X, *et al*. MicroRNA–365 inhibits growth, invasion and metastasis of malignant melanoma by targeting NRP1 expression[J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015, 8(5): 4913–4922.

[29] ZHOU L, WANG Y, OU C, *et al*. microRNA–365–targeted nuclear factor I/B transcriptionally represses cyclin–dependent kinase 6 and 4 to inhibit the progression of cutaneous squamous cell carcinoma[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2015, 65: 182–191.

[30] GAO F, TIAN J. FOXK1, regulated by miR–365–3p, promotes cell growth and EMT indicates unfavorable prognosis in breast cancer[J]. OncoTargets and Therapy, 2020, 13: 623–634.

[31] BRUNET A, GREER E L. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression[J]. Oncogene, 2005, 24(50): 7410–7425.

[32] HUANG H, TINDALL D J. Dynamic FoxO transcription factors[J]. Journal of Cell Science, 2007, 120(Pt 15): 2479–2487.

[33] YUAN C, WANG L, ZHOU L, *et al*. The function of FOXO1 in the late phases of the cell cycle is suppressed by PLK1–mediated phosphorylation[J]. Cell Cycle, 2014, 13(5): 807–819.

[34] YUAN Z, BECKER E B E, MERLO P, *et al*. Activation of FOXO1 by Cdk1 in cycling cells and postmitotic neurons[J]. Science, 2008, 319(5870): 1665–1668.

[35] VAZIRI–GOHAR A, ZHENG Y, HOUSTON K D. IGF–1 receptor modulates FoxO1–mediated tamoxifen response in breast cancer cells[J]. Molecular Cancer Research, 2017, 15(4): 489–497.

[36] CHANG Y M, ZHAO Y F, CAO Y L, *et al*. Liver X receptor α inhibits osteosarcoma cell proliferation through up–regulation of FoxO1[J]. Cellular Physiology & Biochemistry, 2013, 32(1): 180–186.

[37] LI Z C, ZHANG L M, WANG H B, *et al*. Curcumin inhibits lung cancer progression and metastasis through induction of FOX–O1[J]. Tumour Biology, 2014, 35(1): 111–116.

[38] HAN D F, ZHANG J X, WEI W J, *et al*. Fenofibrate induces G0/G1 phase arrest by modulating the PPARα/FoxO1/p27 kip pathway in human glioblastoma cells[J]. Tumour Biology, 2015, 36(5): 3823–3829.

[39] VISCONTI R, DELLA MONICA R, GRIECO D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double–edged sword[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2016, 35(1): 153.

[40] WENZEL E S, SINGH A T K. Cell–cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer[J]. In Vivo, 2018, 32(1): 1–5.

[41] PERNAS S, TOLANEY S M, WINER E P, *et al*. CDK4/6 inhibition in breast cancer: current practice and future directions[J]. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2018, 10: 17588–35918786451.

[42] LI M, ZHENG W, WANG C. CyclinD1 promotes lymph node metastasis by inducing lymphangiogenesis in human ovarian carcinoma[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2018, 11(7): 3726–3731.

[43] SEMCZUK A, JAKOWICKI J A. Alterations of pRb1–cyclin D1–cdk4/6–$p16^{INK4A}$ pathway in endometrial carcinogenesis[J]. Cancer Letters, 2004, 203(1): 1–12.