

- Semin Immunopathol, 2010, 32(1): 17-31.
- 14 Guo Z, Wen Z, Qin A, et al. Antisense oligonucleotide treatment enhances the recovery of acute lung injury through IL-10-secreting M2-like macrophage-induced expansion of CD4+ regulatory T cells [J]. J Immunol, 2013, 190(8): 4337-4348.
- 15 Gangemi S, Parisi P, Ricciardi L, et al. Is interleukin-22 a possible indicator of chronic heart failure's progression? [J]. Arch Gerontol Geriatr, 2010, 50(3): 311-314.
- 16 Huang Y, Xu T, Li J. Th22 cell is a gradually proved potential biomarker for acute coronary syndrome [J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 813926.
- 17 Zhang L, Wang T, Wang XQ, et al. Elevated frequencies of circulating Th22 cell in addition to Th17 cell and Th17/Th1 cell in patients with acute coronary syndrome [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e71466.
- 18 Guo Y, Wu W, Cen Z, et al. IL-22-producing Th22 cells play a protective role in CVB3-induced chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy by inhibiting myocardial fibrosis [J]. Virol J, 2014, 11: 230.
- 19 Turner NA, Porter KE. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction [J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2013, 6(1): 5.
- 20 Rog-Zielinska EA, Norris RA, Kohl P, et al. The Living Scar-Cardiac Fibroblasts and the Injured Heart [J]. Trends Mol Med, 2016, 22(2): 99-114.
- 21 Moore-Morris T, Guimarães-Camboa N, Yutzev KE, et al. Cardiac fibroblasts: from development to heart failure [J]. J Mol Med (Berl), 2015, 93(8): 823-830.
- 22 Blaxall BC, Baudino TA, Kirshenbaum LA. Cardiac fibroblasts and cellular cross talk in heart failure [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2012, 5(6): 737-738.

[收稿日期 2016-01-28][本文编辑 黄晓红]

课题研究·论著

miR-1284 过表达对胃癌细胞中 EIF4A1 的影响

詹泽栩, 韦尉元, 曹稳琬, 余 晗, 肖 强, 谢玉波

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:81060201); 广西科学研究与技术开发计划项目(编号:桂科攻 14124004-1-9); 广西研究生教育创新计划项目(编号:YCBZ2015028)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科(詹泽栩, 韦尉元, 曹稳琬, 余 晗, 肖 强), 麻醉科(谢玉波)

作者简介: 詹泽栩(1989-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 胃癌的基础研究与临床。E-mail: 236378803@qq.com

通讯作者: 肖 强(1957-), 男, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向: 胃癌的基础研究与临床。E-mail: xiaoqiang20050@aliyun.com

【摘要】 目的 通过验证 miR-1284 可能的靶基因, 从而探讨 miR-1284 影响胃癌发生发展可能的分子作用机制。**方法** 采用生物信息学软件预测 miR-1284 可能的靶基因。以慢病毒介导 miR-1284 过表达转染胃癌 MGC-803 细胞为 miR-1284 组(LV-miR-1284 组), 转染空载体慢病毒载体的细胞为阴性对照组, 未转染慢病毒载体的细胞为空白对照组。运用荧光定量 PCR 检测各组 EIF4A1 基因的表达, Western blot 法检测各组 EIF4A1 蛋白的表达, 通过双荧光素酶对 EIF4A1 进行靶基因验证。**结果** 与阴性对照组和空白对照组比较, miR-1284 组的 EIF4A1 基因和蛋白的表达量下降, 双荧光素酶示 miR-1284 能与靶基因 EIF4A1 的 3' UTR 的结合。**结论** miR-1284 通过作用其靶基因 EIF4A1 发挥生物功能学作用。

【关键词】 胃癌; miR-1284; EIF4A1

【中图分类号】 R 735.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2016)02-0097-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.02.02

Effects of overexpression of miR-1284 on EIF4A1 in gastric cancer cells ZHAN Ze-xu, WEI Wei-yuan, CAO Wen-long, et al. Department of Gastrointestine and Gland Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

【Abstract】 Objective To explore the potential target genes of miR-1284 and its possible molecular mechanisms on gastric cancer development. **Methods** The bioinformatics software was used to predict the target genes of miR-1284. The slow virus mediated miR-1284 transfection MGC-803 gastric cancer cells were taken as the miR-1284

group(LV-miR-1284). The empty carrier slow virus vector transfection cells were taken as the negative control group and the untransfected slow virus carrier cells as the blank control group. Fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of target genes EIF4A1 and Western blot was used to detect EIF4A1 protein expression and its target genes were verified by dual luciferase EIF4A1. **Results** Compared with those in the negative control group and the blank control group, the expressions of gene and protein of EIF4A1 were decreased in the miR-1284 group, Dual luciferase test demonstrated that miR-1284 could combine with target genes EIF4A1 3' UTR. **Conclusion** miR-1284 plays a role in biological functions by combining with its target gene EIF4A1.

[Key words] Gastric cancer; miR-1284; EIF4A1

胃癌的发病率居全球恶性肿瘤第4位,病死率居我国消化道恶性肿瘤第一位。虽然目前胃癌采取手术、化疗和放疗等综合手段治疗,但其治疗效果仍不理想。现如今胃癌的病因仍不清楚,研究胃癌的发病机制仍是提高胃癌治疗效果的根本所在。近年来,已有研究提出 miRNA 具有调控癌基因或抑癌基因的功能,且约有 50% 人类 miRNA 基因定位于肿瘤相关染色体区域^[1]。大量研究^[2]也表明了胃癌的发展与 miRNA 有关联。Chen 等^[3]的研究提出 miR-1284 在淋巴结转移阳性的胃癌组织比转移阴性的表达少,提示 miR-1284 的表达可能参与调控胃癌的发生发展及转移。前期研究^[4,5]证实了 miR-1284 能调节胃癌细胞的侵袭转移能力。本研究通过构建 miR-1284 慢病毒,上调胃癌细胞 miR-1284,观察验证其可能发挥作用的下游基因来探讨其影响胃癌发生发展可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 miR-1284 基因慢病毒过表达重组慢病毒颗粒由上海吉凯生物技术有限公司提供。逆转录试剂盒及扩增试剂盒购自 TaKaRa 公司。重组质粒由上海吉凯生物技术有限公司提供。X-tremegene HP 试剂购自 Roche 公司。EIF4A1 兔抗人抗体购自 CST 公司,IRDye800 标记的山羊抗兔二抗购自 LiCOR 公司。

1.2 方法

1.2.1 靶基因的预测 利用 Targetscan、miRDB 和 microRNA 三个在线生物信息学软件综合分析相关因素,筛选出 miR-1284 可能存在的靶基因。

1.2.2 细胞培养及稳定转染 将胃癌 MGC-803 细胞置于有 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养液的培养瓶里,并于 37℃,5% CO₂ 饱和湿度条件下的细胞培养箱里常规培养。取对数生长期的 MGC-803 细胞胰酶消化制成细胞悬液,并接种于 6 孔板中,每孔 3.5 × 10⁴ 个/孔,用 20% 胎牛血清 RPMI1640 培养液培养。24 h 后,细胞汇合度达到 50% ~ 60%,按照吉凯公司慢病毒转染说明书操作,将 miR-1284 重组慢病毒

颗粒(Lv-has-miR1284-gfp)和阴性病毒颗粒(Lv-gfp)分别感染 MGC-803 细胞,作为 miR-1284 组和阴性对照组,并设立不做任何处理的一组细胞作为空白对照组。72 h 后用 5 μg/L 嘌呤霉素筛选稳定转染细胞株。

1.2.3 RNA 的提取及评估 采用 TRIzol 法提取人胃癌 MGC-803 各组细胞的总 RNA 并采用紫外分光光度仪测定各组 RNA 的纯度和浓度。应用安捷伦 RNA6000 nano assay 检测 RIN 以评估 RNA 的完整性。

1.2.4 靶基因表达的实时荧光定量 PCR 仪检测 将所提取的总 RNA 按照 TAKARA 公司提供的说明书进行逆转录。三组均以 GAPDH 作为内部参照基因,每组设立 4 个复孔。把逆转录所得目的靶基因 cDNA 在 Roche 实时荧光定量仪上进行扩增检测。采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的靶基因的表达量。(引物序列见表 1)

表 1 EIF4A1 和 GAPDH 的引物序列

基因名称	引物序列
EIF4A1	Forward 5'-ATCCCAGACGCTCTCCCTCAC-3'
	Reverse 5'-CTACCATTTTCTCTCCCCTCCTT-3'
GAPDH	Forward 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
	Reverse 5'-TCGT-GAAGACGCCACTGCA-3'

1.2.5 miR-1284 目的靶基因蛋白表达的 Western blot 法检测 提取 miR-1284 组、阴性对照组、空白对照组三组细胞总蛋白,采用 BCA 法测定各组总蛋白含量。取各组蛋白 100 μg,100℃ 加热变性 5 min 后在 SDS-PAGE 电泳,并转移至 PVDF 膜上,用 TBST 配置的 50 g/L 脱脂牛奶封闭,1 h 后洗膜并将其置于 EIF4A1 兔抗人抗体液(1:1 000)中,4℃ 摇床封闭过夜。隔日洗膜后置于 IRDye800 标记的山羊抗兔抗体液(1:10 000)中,避光摇床 1 h 后洗膜并于红外荧光仪曝光显影。显影后的图像用 Quantity One 软件定量分析。

1.2.6 质粒转染 将处于对数生长期的细胞进行

胰酶消化,制成细胞悬液,按 2×10^4 个/孔接种于 24 孔板中,分成 6 个组别,分别是实验组 1(靶基因 3' UTR 空载质粒 + miR-1284 空载质粒)、实验组 2(靶基因 3' UTR 空载质粒 + miR-1284)、实验组 3(靶基因 3' UTR 质粒 + miR-1284 空载质粒)、实验组 4(靶基因 3' UTR 质粒 + miR-1284)、实验组 5(靶基因 3' UTR 突变体质粒 + miR-1284 空载质粒)、实验组 6(靶基因 3' UTR 突变体质粒 + miR-1284)。于 37°C 、5% CO_2 培养箱里培养至细胞融合度约 60%,使用 X-tremegene HP 转染试剂进行转染:按每转染 1 μg 质粒需要 2 μl X-tremegene HP 的比例,将 X-tremegene HP 转染试剂和所需质粒共同溶解于 100 μl 无血清 opti-MEM 中,室温静置 20 min;将 24 孔板中培养液换成 200 μl 无血清 opti-MEM 培养基;把相应质粒与 X-tremegene HP 的混合液分别加入对应细胞组中, 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 5~6 h 后,换成新鲜的含 10% 胎牛血清培养液;转染 48 h 后观察质粒上荧光标记基因判断转染效率。

1.2.7 靶基因双荧光素酶验证 取上述质粒转染成功细胞,吸去 24 孔板中培养基,加入 500 μl 1X Passive Lysis Buffer,放至 4°C 反应 20 min 左右后吹打混匀,再放至 -80°C 超低温冰箱过夜使其裂解更加彻底。

表 2 RNA 质量检验结果

样 品	D260/D280 ≥ 1.8	D260/D230 ≥ 1.5	总 RNA/ μg	RIN > 6	质量检验结果
miR-1284 组	1.95	1.72	25.57	9.90	Pass
阴性对照组	1.95	1.86	21.28	9.90	Pass
空白对照组	1.95	1.73	24.36	9.90	Pass

2.3 各组细胞目的靶基因 EIF4A1 基因表达量的实时荧光定量 PCR 检测 上调了 miR-1284 的 miR-1284 组其 EIF4A1 的相对表达量比阴性对照组和空白对照组低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。阴性对照组和空白对照组之间差异无统计学意义($P > 0.01$)。见图 2。

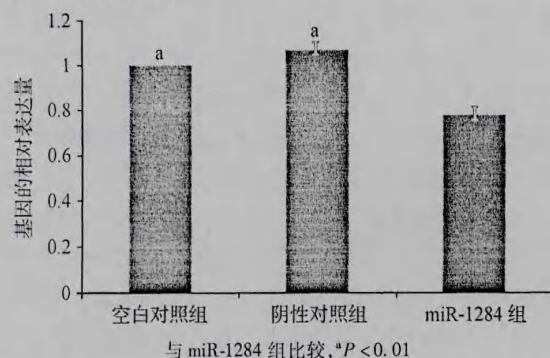


图 2 各组细胞 EIF4A1 的相对表达量

每组设立三个复孔,各取细胞裂解液 40 μl 于 Lockwellmaxisorp 检测板中,加入 20 μl Luciferase Assay Reagent,震荡混匀后立即使用酶标仪检测萤火虫荧光酶荧光值。检测萤火虫荧光酶荧光值后,再在每孔中加入 20 μl Stop & Glo[®] Reagent,震荡混匀并静置 3 min 后使用酶标仪检测海肾荧光酶荧光值。

1.3 统计学方法 应用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 目的靶基因预测结果 miR-1284 在 EIF4A1 的 3'端非翻译区(3'untranslated regions,3'UTR)上有一个保守的靶位点,靶位点类型为 7mem8,“context + score”百分位为 96,表明其与靶位点可能互补。见图 1。



图 1 生物信息学软件预测结果图

2.2 RNA 质量检验结果 各组结果 D260/D280 ≥ 1.8 ,D260/D230 ≥ 1.5 ,说明总 RNA 的纯度高,DNA 和蛋白质的污染少;RIN > 6 表示样本的完整性好,可用于后续实验。见表 2。

2.4 miR-1284 过表达降低靶基因 EIF4A1 蛋白水平 Western blot 结果表明,miR-1284 组的 miR-1284 上调后,其靶基因 EIF4A1 的蛋白表达量低于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3;而阴性对照组和空白对照组之间 EIF4A1 的蛋白表达量无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 4。说明 miR-1284 的过表达可减少 EIF4A1 的蛋白表达。



图 3 Western blot 分析各组的 EIF4A1 蛋白表达图

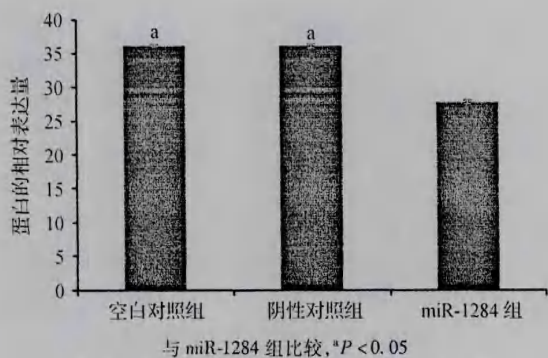


图4 各组 EIF4A1 蛋白水平的半定量分析图

2.5 评估质粒转染效率 各组细胞转染效率 $> 80\%$, 转染效果好, 可用于后续实验。见图 5。

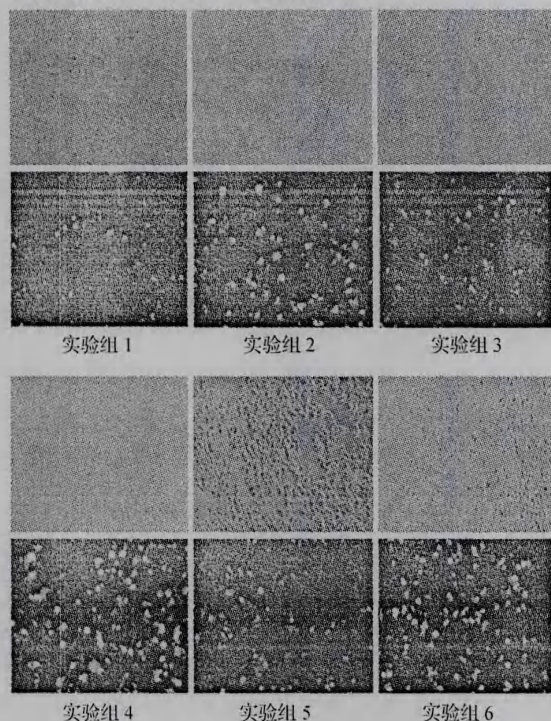


图5 各实验组质粒转染细胞荧光图

2.6 双荧光素酶证实的 miR-1284 靶基因结果 实验组 2 与实验组 4 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 miR-1284 能与靶基因 3' UTR 结合, 能抑制其表达; 实验组 2 与实验组 6 相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 miR-1284 不能与靶基因 EIF4A1 3' UTR 突变体结合, 不能抑制其表达; 实验组 4 与实验组 6 相比, 实验组 6 的数值上升 ($P < 0.05$), 进一步说明将靶基因 EIF4A1 3' UTR 突变后, miR-1284 无法与其结合, 不能抑制其表达。综上, miR-1284 能与靶基因 EIF4A1 的 3' UTR 结合, 能抑制其表达。见图 6。

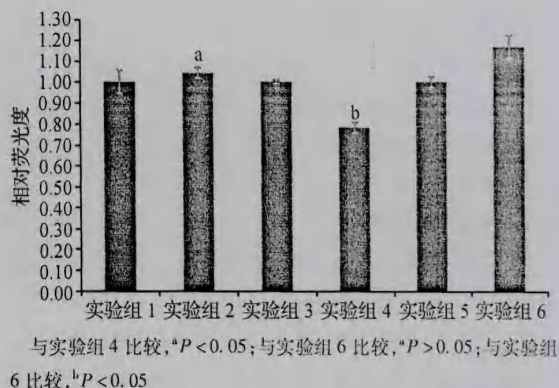


图6 靶基因 EIF4A1 各组 luciferase 相对表达量图

3 讨论

3.1 近年来, 已有大量研究文献^[6,7]表明, microRNA 的上调或者下调将参与细胞相关的信号通路, 从而调节细胞的增殖、分化、凋亡、迁移等生物学行为, 进而影响肿瘤的发生发展。也有相关文献报道 microRNA 能影响胃癌的发生发展, 其中 Chen 等^[3]的研究表明 miR-1284 在淋巴结转移阳性的胃癌组织比转移阴性的表达少, 提示 miR-1284 的表达可能参与调控胃癌的发生发展及转移。我们前期研究^[4,5]的临床病例示胃癌 miR-1284 的表达量低于正常组织, 且人胃癌细胞 SGC-7901 miR-1284 上调后, 其细胞周期阻滞于 G0/G1 期, 凋亡细胞增多, 侵袭转移能力下降, 而裸鼠移植瘤模型中 miR-1284 上调肝肺转移率也明显下降。前期研究已经证实, 上调 miR-1284 能调控胃癌细胞的生物学行为。

3.2 为了进一步明确 miR-1284 调控人胃癌细胞生物学功能的分子机制, 本研究构建 miR-1284 基因转染人胃癌细胞株 MGC-803, 并通过 Targetsacn、miRDB 和 microRNA 三个在线靶基因预测软件筛选出可能作用的靶基因 EIF4A1, 采用实时荧光定量 PCR 证明, 与阴性对照组和空白对照组相比, miR-1284 组的 EIF4A1 基因下调; 同时, Western blot 实验表明 miR-1284 的上调导致 EIF4A1 的蛋白水平下降。并进一步采用双荧光素酶证实了 miR-1284 可与 EIF4A1 的 3' UTR 端结合, 说明 miR-1284 的上调降解了 EIF4A1 基因。有研究^[8]表明, EIF4A1 的阻断可以抑制结直肠癌的发生发展, 与我们实验结果一致, 据此我们推测 EIF4A1 的表达量与肿瘤的发生发展密切相关。

综上所述, miR-1284 可能通过阻断其靶基因 EIF4A1 来影响胃癌细胞的增殖、侵袭和转移, 上调 miR-1284 的表达, 为胃癌的生物学防治提供了一个新的潜在靶标, 值得深入研究和进一步验证。

参考文献

- 1 Mishra PJ, Mishra PJ, Banerjee D, et al. MiRNAs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics [J]. Cell Cycle, 2008, 7 (7): 853-858.
- 2 Huang D, Wang H, Liu R, et al. miRNA27a is a biomarker for predicting chemosensitivity and prognosis in metastatic or recurrent gastric cancer [J]. J Cell Biochem, 2014, 115 (3): 549-556.
- 3 Chen W, Tang Z, Sun Y, et al. miRNA expression profile in primary gastric cancers and paired lymph node metastases indicates that miR-10a plays a role in metastasis from primary gastric cancer to lymph nodes [J]. Exp Ther Med, 2012, 3 (2): 351-356.
- 4 韦尉元, 曹稳琰, 詹泽栩, 等. miR-1284 过表达对人胃癌 SGC-7901 细胞基因表达谱及侵袭转移的影响 [J]. 中国癌症杂志, 2015, 25 (9): 659-664.
- 5 韦尉元, 曹稳琰, 张笑石, 等. MicroRNA -1284 在胃癌中的表达及其作用机制研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31 (3): 440-446.
- 6 Wang X, Zhong H, Wang L, et al. MiR-29 Induces K562 Cell Apoptosis by Down-Regulating FoxM1 [J]. Med Sci Monit, 2015, 15 (21): 3115-3120.
- 7 Sun X, Du P, Yuan W, et al. Long non-coding RNA HOTAIR regulates cyclin J via inhibition of microRNA-205 expression in bladder cancer [J]. Cell Death Dis., 2015, 6: e1907.
- 8 Wiegner A, Uthe FW, Jamieson T, et al. Targeting translation initiation bypasses signaling crosstalk mechanisms that maintain high MYC levels in colorectal cancer [J]. Cancer Discov, 2015, 5 (7): 768-781.

[收稿日期 2015-10-27][本文编辑 黄晓红]

课题研究·论著

超声挤压征和(或)浸润征在肝脏良恶性微小病变鉴别诊断中的价值

许春梅, 刘天奇, 陈彦红, 莫祥兰, 胡巧, 黄瑛

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划课题(编号: 桂科攻 1140003B-65)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院超声科(许春梅, 陈彦红, 胡巧, 黄瑛), 肝胆腺体外科(刘天奇), 病理科(莫祥兰)

作者简介: 许春梅(1966-), 女, 医学硕士, 主任医师, 研究方向: 腹部超声诊断。E-mail: ld9696@aliyun.com

[摘要] 目的 探讨超声挤压征和(或)浸润征在肝脏良恶性微小病变鉴别诊断中的价值。方法 对 164 例共 178 个经穿刺或手术病理证实直径 ≤ 2.0 cm 的肝内实质性病变进行二维及彩色多普勒血流显像分析, 以肿块挤压征和(或)浸润征作为诊断肝脏微小恶性病变的指标。结果 肝脏微小恶性肿瘤挤压征和(或)浸润征检出率(75.24%, 79/105)明显高于肝脏良性病变(4.11%, 3/73) ($P < 0.05$)。以有挤压征和(或)浸润征诊断肝脏微小恶性病变的敏感度为 75.24%, 特异度为 95.89%, 准确性为 83.71%, Kappa 值为 0.679, ROC 曲线下面积为 0.846 (95% CI = 0.786 ~ 0.906)。结论 超声挤压征和(或)浸润征在肝脏微小病变的良恶性鉴别诊断中有较大的价值, 可为肝脏恶性肿瘤的筛查提供重要的参考。

[关键词] 肝肿瘤; 超声检查; 微小**[中图分类号]** R 445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2016)02-0101-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2016.02.03

The value of compression and/or invasion signs in ultrasonic diagnosis of minimal hepatic tumors XU Chun-mei, LIU Tian-qi, CHEN Yan-hong, et al. Department of Ultrasonography, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the value of compression and/or invasion signs in ultrasonic diagnosis of minimal benign and malignant hepatic tumors. **Methods** 178 hepatic lesions less than 2.0 cm in 164 cases proved by puncture or operation pathology were examined by the dimensional ultrasonography and color Doppler flow. The compression and/or invasion signs were regarded as a criterion of malignant hepatic tumors. **Results** The detection rate