

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.11.004

· 基础研究(专题) ·

## lncRNA FOXD2-AS1 通过调控 miR-185-5p/CCND2 分子轴诱导胃癌细胞 MGC-803 对阿帕替尼的耐药性

吴晓霞<sup>1</sup>, 单永锋<sup>1</sup>, 曹斐<sup>1</sup>, 张彬彬<sup>1</sup>, 王昊楠<sup>1</sup>, 刘慧<sup>1</sup>, 徐妍<sup>2</sup>, 郁皓<sup>1</sup>(1. 江苏省无锡市第五人民医院 肿瘤科, 江苏 无锡 214016; 2. 江苏省无锡市第二人民医院 肿瘤科, 江苏 无锡 214016)

**[摘要]** **目的:**探讨 lncRNA FOXD2-AS1 (FOXD2-AS1) 通过调控 miR-185-5p/CCND2 分子轴参与胃癌细胞对阿帕替尼耐药性的分子机制。**方法:**收集无锡市第五医院 2016 年 4 月至 2017 年 12 月间收治的资料完整的 25 例胃癌患者癌组织和相应癌旁组织标本, 采用 qRT-PCR 检测 FOXD2-AS1、miR-185-5p 和 CCND2 在胃癌组织或细胞系中的表达水平; 采用 CCK-8、Transwell 和 Annexin V-FITC/PI 双染流式术检测胃癌细胞对阿帕替尼药物的敏感性; 采用双荧光素酶报告基因验证 FOXD2-AS1、miR-185-5p 和 CCND2 的靶向关系, 并通过 Western blotting 和 qRT-PCR 检测其调控关系。**结果:**FOXD2-AS1 在胃癌组织和阿帕替尼耐药细胞株中高表达; 同时, 过表达 FOXD2-AS1 可促进胃癌 MGC-803/AP 细胞对阿帕替尼的耐药性。双荧光素酶报告基因证实 FOXD2-AS1 靶向作用 miR-185-5p 并下调其表达水平。miR-185-5p 通过抑制胃癌 MGC-803/AP 细胞增殖、侵袭和促进凋亡进而下调 FOXD2-AS1 对胃癌细胞阿帕替尼耐药性的促进作用。miR-185-5p 可靶向负调控 CCND2 的表达, FOXD2-AS1 通过下调 miR-185-5p 对 CCND2 的抑制作用进而促进胃癌 MGC-803/AP 细胞增殖、侵袭和抑制凋亡, 从而上调胃癌细胞对阿帕替尼的耐药性。**结论:**FOXD2-AS1 通过调控 miR-185-5p/CCND2 分子轴诱导胃癌细胞对阿帕替尼的耐药性。

**[关键词]** 胃癌; MGC-803 细胞; MGC-803/AP 细胞; lncRNA FOXD2-AS1; miR-185-5p; CCND2; 阿帕替尼

**[中图分类号]** R730.51; R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)11-1104-09

## Long noncoding RNA FOXD2-AS1 induced gastric cancer cell MGC-803 to apatinib resistance by regulating miR-185-5p/CCND2 modulating axis

WU Xiaoxia<sup>1</sup>, SHAN Yongfeng<sup>1</sup>, CAO Fei<sup>1</sup>, ZHANG Binbin<sup>1</sup>, WANG Haonan<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1</sup>, XU Yan<sup>2</sup>, YU Hao<sup>1</sup>(1. Department of Oncology, the Fifth People's Hospital of Wuxi City, Wuxi 214016, Jiangsu, China; 2. Department of Oncology, the second People's Hospital of Wuxi City, Wuxi 214016, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the molecular mechanism of lncRNA FOXD2-AS1 participating in apatinib resistance in gastric cancer cells by regulating miR-185-5p/CCND2 axis. **Methods:** The gastric cancer tissues and corresponding paracancerous tissues of 25 patients with gastric cancer were collected from April 2016 to December 2017 in the Fifth People's Hospital of Wuxi City. The expressions of FOXD2-AS1, miR-185-5p, and cyclin D2 (CCND2) in gastric cancer tissues or cell lines were examined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). CCK-8 assay, Transwell assay and Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry assay were applied to assess the sensitivity of gastric cancer cells to apatinib. The interaction between FOXD2-AS1, miR-185-5p and CCND2 was explored by dual luciferase reporter gene assay, which was then confirmed by qRT-PCR, and Western blotting. **Results:** FOXD2-AS1 was highly expressed in gastric cancer tissues and apatinib-resistant gastric cancer cells. Over-expression of FOXD2-AS1 promoted apatinib-resistance of MGC-803/AP cells. Dual luciferase reporter gene assay confirmed that FOXD2-AS1 directly interacted with miR-185-5p and suppressed its expression. miR-185-5p significantly abolished the promotion effect of FOXD2-AS1 on apatinib-resistance via inhibiting cell proliferation, invasion and promoting apoptosis of gastric MGC-803/AP cells. miR-185-5p could negatively regulate CCND2 expression; and FOXD2-AS1 promoted the cell proliferation, invasion and inhibited apoptosis of MGC-803/AP cells via down-regulating the inhibition effect of miR-185-5p on CCND2, thus further enhanced the apatinib-resistance of gastric cancer cells. **Conclusion:** FOXD2-AS1 induced apatinib-resistance of gastric cancer cells by regulating miR-185-5p/CCND2 axis.

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金资助项目 (No. 81502365); 南京医科大学科技发展基金资助项目 (No. 2017NJMU175)。Project supported by the National Natural Science for Youth Scholar Foundation of China (No. 81502365), and the Science and Technology Development Foundation of Nanjing Medical University (No. 2017NJMU175)

**[作者简介]** 吴晓霞 (1981-), 女, 本科, 主治医师, 主要从事肿瘤内科基础与临床研究, E-mail: wxdwrmyywx@163.com

**[通信作者]** 郁皓 (YU Hao, corresponding author), 硕士, 副主任医师, 主要从事肿瘤内科的基础与临床研究, E-mail: yuhao731117@163.com

[Key words] gastric cancer; MGC-803 cell; MGC-803/AP cell; lncRNA FOXD2-AS1; miR-185-5p; CCND2; apatinib

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(11):1104-1112. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.11.004]

国家癌症中心最新数据显示,我国胃癌居恶性肿瘤死亡率第二位,严重威胁我国人民的健康甚至生命<sup>[1]</sup>。化疗是晚期胃癌患者治疗的主要手段,然而,药物耐药性大大降低了化疗效果。近期有研究报道,胃癌细胞对 5-氟胞嘧啶<sup>[2]</sup>、长春新碱<sup>[3]</sup>、顺氯氨铂<sup>[4-5]</sup>产生耐药性的研究中,均发现有相关的非编码 RNA 参与耐药机制。近年来,长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 已被证实有多种肿瘤的增殖、转移和耐药中发挥了重要调节作用<sup>[6-9]</sup>,然而,目前 lncRNA 在胃癌耐药中的作用尚不清楚。为此,本研究探讨 lncRNA FOXD2-AS1 通过调控 miR-185-5p/CCND2 分子轴参与胃癌细胞对阿帕替尼耐药性的分子机制,为临床化疗耐药难题寻找新的治疗靶点和分子标志物。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象的收集

收集 2016 年 4 月至 2017 年 12 月间我院收治的资料完整的 25 例胃癌患者,经手术切除的胃癌组织和癌旁组织,迅速保存于液氮中。

入选标准:(1)经电子胃镜及活检病理、X 线钡餐检查、螺旋 CT 或正电子发射成像检查结果确认为胃(包括胃-食管连接部)腺癌;(2)治疗前 2 周没有经历放疗化疗等治疗手段。

排除标准:(1)之前进行任何放疗或化疗的患者;(2)患者不同意样本的采集;(3)不能耐受手术的患者;(4)合并有免疫系统疾病的患者。

所有研究对象对本研究均签署知情同意书,本研究经无锡市第五人民医院伦理委员会批准。

### 1.2 药品、试剂与仪器

FOXD2-AS1、miR-185-5p 和 CCND2 的 siRNAs 和 mimics 购自上海吉玛公司,DMEM 和胎牛血清购自美国 Biological Industries 公司,青霉素和链霉素均购自北京雷根生物技术有限公司,Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 eBioscience 公司,CCK-8 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司,Transwell 小室购自美国康宁公司,DNA 酶和 Lipofectamine™ 2000 和逆转录试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司,高纯总 RNA 快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,全蛋白提取试剂盒、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒均购自美国 Bio-Rad 公司,免疫印迹一抗和二抗均购于购自美国 CST 公司;双荧光素酶报告基因试剂盒和报告基因载体均购自 Promega 公司。

酶标仪、荧光定量 PCR 仪、电泳仪和凝胶成像系统均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,超速冷冻离心机和电泳槽均购自北京六一生物科技有限公司。

### 1.3 细胞培养

人胃癌细胞株(MGC-803、SGC-7901 和 BGC-823)和人胃黏膜细胞(GES-1)均购自中科院上海细胞研究所,胃癌细胞株采用含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 μg/ml 的 DMEM 培养液在 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养。

### 1.4 胃癌耐药细胞株的建立

将对数生长期胃癌 MGC-803 细胞,采用阿帕替尼开始作用质量浓度为 0.001 μg/ml 刺激 48 h,弃去培养基,加入新鲜的 DMEM 培养基继续培养,观察细胞活力,若无明显死亡则选择该对数期细胞逐步增加阿帕替尼质量浓度,反复传代培养,直至最后在阿帕替尼 1 μg/ml 下能够稳定存活,即为 MGC-803/AP 耐药细胞。

### 1.5 细胞转染

选取对数生长期的胃癌 MGC-803 细胞,采用胰酶消化后,再利用 DMEM 培养基调整密度为 1×10<sup>5</sup> 个/ml。然后,将细胞接种到 6 孔板,每孔添加 2 ml 细胞悬液,并于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h,随后进行 FOXD2-AS1 siRNA 和 pcDNA-FOXD2-AS1 转染,其转染方法参考 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书,转染 48 h 后于荧光显微镜下观察细胞的转染效果。

同时,选取对数生长期的 MGC-803/AP 细胞,采用胰酶消化后,再利用 DMEM 培养基调整密度为 1×10<sup>5</sup> 个/ml。然后,将细胞接种到 6 孔板,每孔添加 2 ml 细胞悬液,并于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h,随后进行 FOXD2-AS1 siRNA、CCND2 siRNA、pcDNA-FOXD2-AS1 和 miR-185-5p mimics 转染,其转染方法参考 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书,转染 48 h 后于荧光显微镜下观察细胞的转染效果。

### 1.6 qRT-PCR 检测胃癌组织和细胞中 FOXD2-AS1 的表达水平

收集临床样本及转染后 48 h 的胃癌 MGC-803 和 MGC-803/AP 细胞,并采用 TRIzol 一步法分别提取组织和培养好的细胞中总 RNA;随后,采用 DNA 酶进行处理,并取 1 μg RNA 反转录制备 cDNA。然后,取 2 μl 反转录产物进行 PCR 检测,采用 U6 和 GAPDH 作为内参,引物序列如表 1 所示。随后,按试剂盒说明建立终体积为 20 μl 的 PCR 反应体系 2 μl 反转录产物、10 μl SYBR Green Mix、上下游引物(10 μmol/L)

各 0.5  $\mu\text{l}$ 。PCR 热循环参数为: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 然后 3 步反应: 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 共进行 45 个循环。检测结果采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法进行计算。

表 1 引物序列  
Tab.1 Primer sequence

Primer	Sequence
U6	F: 5'-GAGGCACAGCGGAACG-3' R: 5'-CTACCACATAGTCCAGG-3'
GAPDH	F: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' R: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGHACC-3'
FOXD2-AS1	F: 5'-CCGCGTAAGCCTCATAGAAG-3' R: 5'-GGGAGTAGGGTGAGGAAAGG-3'
miR-185-5p	F: 5'-GGATTGGAGAGAAAGGCAG-3' R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
CCND2	F: 5'-GCAGAACCTGTTGACCATCG-3' R: 5'-GCTTGC GAAGGATGTGCTC-3'

### 1.7 Western blotting 检测胃癌细胞中 CCND2 蛋白的表达

提取蛋白后, 依据二喹啉甲酸试剂盒的指导要求检测蛋白浓度。上样缓冲液加入萃取的蛋白后, 加热至 95  $^{\circ}\text{C}$ , 维持 10 min。每孔样品的载药量是 30  $\mu\text{g}$ , 添加 10% 的聚丙烯酰胺凝胶以分离蛋白。凝胶电泳的电压控制在 80~120 V, 湿式转运和转膜的电压控制在 100 mV, 持续 45~70 min。在聚偏二氟乙烯转膜后, 蛋白密封于 5% 的牛血清蛋白中维持 1h, 再向其中加入一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  下过夜培养。洗膜缓冲液冲洗蛋白 3 次, 每次 5 min, 随后加入二抗, 温室中培养 1 h。再一次洗膜 3 次后, 加入化学发光试剂显影蛋白。GAPDH 用作内参, Bio-rad Gel DoleZ 成像器用来成像蛋白, 采用 Image J 软件分析目的蛋白带的灰度水平。

### 1.8 CCK-8 实验检测胃癌细胞的增殖水平

将处于对数生长期的胃癌 MGC-803 和 MGC-803/AP 细胞接种于 96 孔板, 每孔含细胞  $10^4$  个, 每孔含培养基 100  $\mu\text{l}$ 。于待检测前 1 h, 向每孔加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 溶液。将培养板在培养箱内孵育 1~4 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度 ( $D$ ), 分析胃癌细胞的增殖活力。

### 1.9 Transwell 实验检测胃癌细胞的迁移能力

选择转染细胞为实验组, 未转染为对照组。分别将各处理组细胞用胰酶消化处理后, 接种于 Transwell 小室 24 孔板, 上室加 100  $\mu\text{l}$  (密度  $2 \times 10^5/\text{ml}$ ) 细胞悬液, 下室加 250  $\mu\text{l}$  含 10% 胎牛血清的培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 h 后, 取出小室, 棉签擦去微孔膜上室的细胞, PBS 小心冲洗小室上下面 2

遍, 4% 的多聚甲醛固定侵袭并黏附到小室微孔膜下面的细胞 15 min, 结晶紫染色 15 min, PBS 冲洗小室, 干燥后置于 100 倍的倒置显微镜观察。

### 1.10 Annexin V-FITC/PI 双染流式术检测胃癌细胞凋亡

流式细胞仪用于检测细胞凋亡情况, 选取转染组和为转染组 MGC-803 和 MGC-803/AP 细胞并培养至对数生长期, PBS 清洗 2 次, 均匀地混合细胞与 500  $\mu\text{l}$  预冷的  $1 \times$  结合缓冲液, 5  $\mu\text{l}$  Annexin-V-FITC, 室温避光孵育 15 min, 然后在上机前 5 min 再加入 2.5  $\mu\text{l}$  PI 染色, 之后上机检测 MGC-803 和 MGC-803/AP 细胞的凋亡情况。

### 1.11 双荧光素酶报告基因检测 FOXD2-AS1、miR-185-5p 和 CCND2 的相互作用情况

首先将 FOXD2-AS1 的候选靶分子 miR-185-5p 3' UTR 靶序列或 miR-185-5p 的候选靶基因 CCND2 3' UTR 靶序列插入到萤火虫荧光素酶基因下游。将表达载体 pcDNA-EGFP-pre-FOXD2-AS1 与其靶基因 miR-185-5p 验证载体 pmirGLO-FOXD2-AS1-miR-185-5p 3' UTR; 将表达载体 pcDNA-EGFP-pre-miR-185-5p 与其靶基因 CCND2 验证载体 pmirGLO-miR-185-5p-CCND2 3' UTR 分别共转染到 293T 细胞, 并设置空质粒载体与 FOXD2-AS1 或 miR-185-5p 表达载体共转染对照。具体方法为: 在 24 孔板中, 对于每孔细胞转染 pmir-GLO-miR-基因 3' UTR 200 ng、pcDNA-EGFP-pre-miRNA 600 ng 及阴性对照 30 pmol/L。50  $\mu\text{l}$  Opti-MEM I 培养基稀释 2  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 试剂后, 室温孵育 5 min; 混合需转染的 DNA 和稀释的 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, 室温孵育 20 min 后将复合物加到含 0.4 ml Opti-MEM I 培养基的细胞中, 轻轻摇动培养板混匀; 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 8 h, 换 0.5 ml 含 10% 胎牛血清、不含抗生素的正常 DMEM 培养基, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 h, 收集细胞。荧光素酶检测按照双荧光素酶报告基因试剂盒说明书, 采用酶标仪检测萤火虫和海肾荧光值, 并以海肾荧光值作为内参。

### 1.12 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 两组间比较采用  $t$  检验, 采用 GraphPad Prism 7 对实验数据进行相关图片的绘制。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

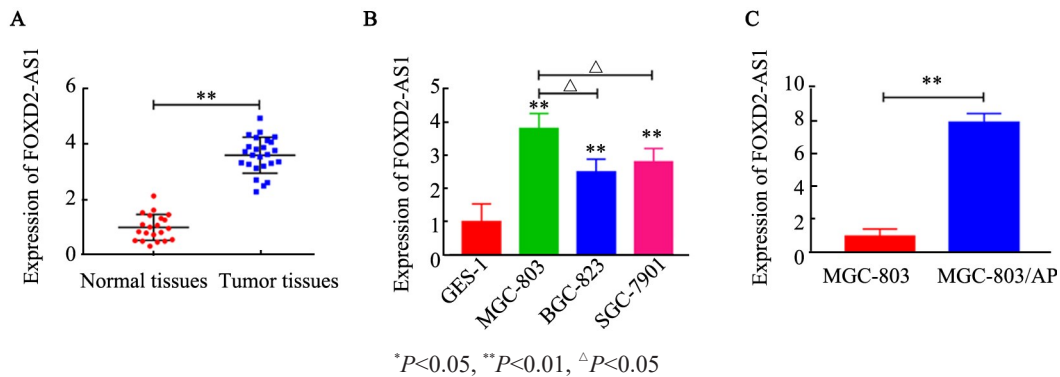
## 2 结果

### 2.1 FOXD2-AS1 在胃癌患者组织、细胞系和阿帕替尼耐药胃癌细胞株 MGC-803/AP 中的表达水平

qRT-PCR 检测结果显示, FOXD2-AS1 在胃癌组

组织中的表达水平明显高于正常组织 ( $P < 0.01$ , 图 1A)。同时, FOXD2-AS1 在胃癌细胞系 (MGC-803、BGC-823 和 SGC-7901) 中的表达水平显著高于人胃上皮细胞 GES-1 (均  $P < 0.01$ , 图 1B), 且 MGC-803 细胞中 FOXD2-AS1 的表达水平明显高于 BGC-823 和 SGC-

7901 (均  $P < 0.05$ , 图 1B); FOXD2-AS1 在 MGC-803/AP 细胞中的表达水平明显高于 MGC-803 细胞 ( $P < 0.01$ , 图 1C)。由此可知, FOXD2-AS1 的异常表达可能与胃癌发生发展及阿帕替尼耐药性有关。



A-C: FOXD2-AS1 expression in gastric cancer tissues, cell lines and MGC-803/AP cells was detected by qRT-PCR

图 1 qRT-PCR 检测 FOXD2-AS1 在胃癌组织和细胞中表达水平

Fig.1 Expression of FOXD2-AS1 in gastric tissues and cell lines was detected by qRT-PCR

## 2.2 FOXD2-AS1 对胃癌细胞生物学行为的影响

qRT-PCR 检测结果 (图 2A、B) 显示, FOXD2-AS1 敲降后在两种细胞中的表达水平明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ); FOXD2-AS1 过表达后在两种细胞中的表达水平明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。CCK-8 检测结果 (图 2C、D) 表明, 沉默 FOXD2-AS1 能够显著抑制 MGC-803 和 MGC-803/AP 细胞增殖活力 ( $P < 0.05$ ), 而过表达 FOXD2-AS1 可以显著促进 MGC-803 和 MGC-803/AP 细胞增殖活力 ( $P < 0.05$ )。Transwell 检测结果 (图 2E、F 和 I) 显示, 相比于对照组, 沉默 FOXD2-AS1 显著抑制了 MGC-803 和 MGC-803/AP 细胞侵袭能力 ( $P < 0.01$ )。Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测结果 (图 2G、H 和 J) 表明, 沉默 FOXD2-AS1 显著促进了 MGC-803 和 MGC-803/AP 细胞凋亡 ( $P < 0.01$ )。由此可知, 沉默 FOXD2-AS1 显著促进了 MGC-803 和 MGC-803/AP 细胞中阿帕替尼诱导细胞凋亡和抑制细胞增殖、侵袭能力。

## 2.3 FOXD2-AS1 对 miR-185-5p 表达的调控作用

通过生物信息学数据库 StarBase V 2.0 预测 miR-185-5p 可能是 FOXD2-AS1 的靶基因, 其预测序列如图 3A 所示。双荧光素酶报告基因验证结果显示, 过表达 miR-185-5p 可以使荧光素酶活性显著下降 ( $P < 0.01$ , 图 3B), 而共转染 miR-185-5p mimics 和靶向位点发生突变的 pmirGLO-FOXD2-AS1-MUT 载体, miR-185-5p 对荧光素酶活性的抑制作用丧失。qRT-PCR 分析结果显示, FOXD2-AS1 过表达后显著抑制 miR-185-5p 的表达水平 ( $P < 0.01$ , 图 3C), 而敲降

FOXD2-AS1 的表达可明显促进 miR-185-5p 的表达 ( $P < 0.001$ , 图 3C)。由此可知, FOXD2-AS1 是 miR-185-5p 的直接靶点, 且 FOXD2-AS1 可负调控 miR-185-5p 的表达。

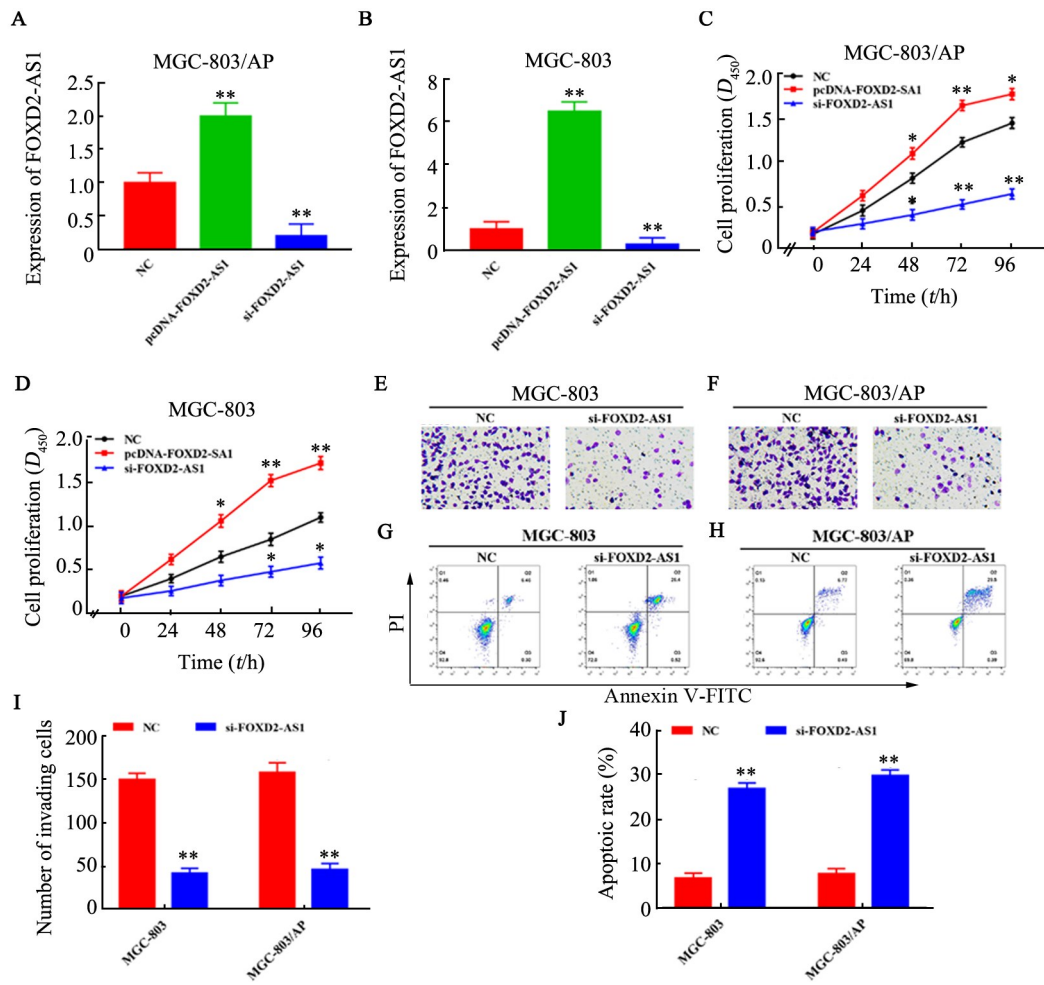
## 2.4 过表达 miR-185-5p 对 MGC-803/AP 细胞生物学行为的影响

CCK-8 检测结果显示, miR-185-5p 过表达后可显著抑制 MGC-803/AP 细胞增殖活力, 而同时过表达 miR-185-5p 与 FOXD2-AS1 可显著恢复 MGC-803/AP 的增殖活力 ( $P < 0.01$ , 图 4A)。Transwell 检测结果表明, miR-185-5p 过表达后可显著抑制 MGC-803/AP 的侵袭能力 ( $P < 0.01$ , 图 4B、D), 而同时过表达 miR-185-5p 和 FOXD2-AS1 后对细胞的侵袭能力与对照组无显著差异。流式细胞仪检测结果显示, miR-185-5p 过表达后可显著促进 MGC-803/AP 细胞凋亡 ( $P < 0.01$ , 图 4C、E), 而同时转染 miR-185-5p mimics 和 pcDNA-FOXD2-AS1 后对 MGC-803/AP 细胞凋亡的影响与对照组没有显著差异。由此可知, FOXD2-AS1 通过下调 miR-185-5p 促进 MGC-803/AP 细胞增殖、侵袭和抑制细胞凋亡。

## 2.5 miR-185-5p 对 CCND2 表达的调控作用

生物信息学数据库 TargetScan 对 miR-185-5p 预测发现, CCND2 是 miR-185-5p 的候选靶基因, miR-185-5p 可以结合 CCND2 的 3' UTR (图 5A)。荧光素酶报告基因验证实验发现, miR-185-5p 可以负调控 CCND2 的表达 ( $P < 0.01$ , 图 5B)。Western blotting 检测结果显示, miR-185-5p 过表达后可显著抑制

CCND2在MGC-803/AP细胞中的表达水平( $P < 0.01$ ), 因,并且miR-185-5p可负调控CCND2的表达。图5C,D)。由此可知,CCND2是miR-185-5p的靶基

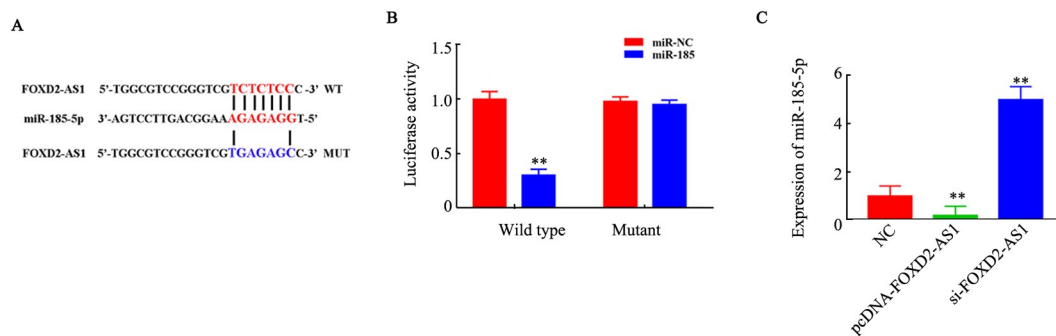


\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NC group

A-B: The expression of FOXD2-AS1 was measured by qRT-PCR; C-D: The cell proliferation viability of MGC-803 and MGC-803/AP cells was by CCK-8; E, F and I: The invasion capability of MGC-803 and MGC-803/AP cells was detected by Transwell assay( $\times 100$ ); G, H and J: The percentage of apoptosis cells was measured by flow cytometry

图2 敲降FOXD2-AS1促进了胃癌细胞增殖、侵袭和抑制凋亡

Fig. 2 Silencing of FOXD2-AS1 promoted cell proliferation, invasion and inhibited apoptosis of gastric cancer

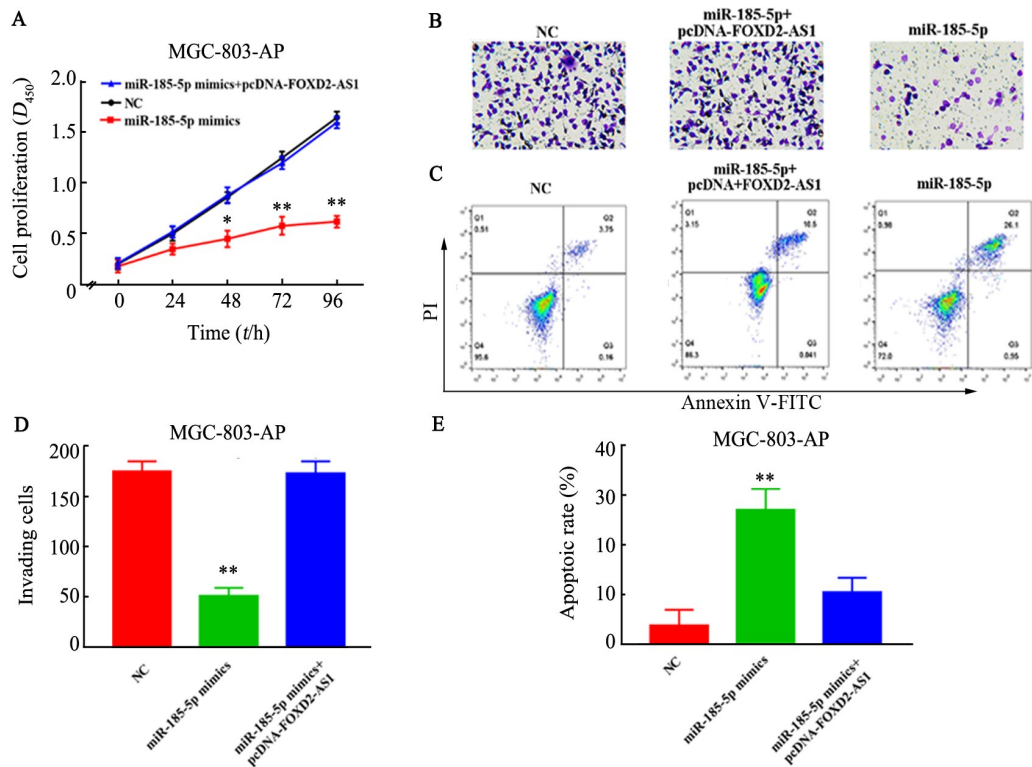


\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs miR-NC group or NC group

A: The bioinformatics analysis result showed that FOXD2-AS1 had a binding site in miR-185-5p; B: The luciferase activity in miR-185-5p-wt transfected with FOXD2-AS1 was lower than that in NC group detected by dual-luciferase reporter assay; C: The expression of miR-185-5p was detected by qRT-PCR

图3 FOXD2-AS1对miR-185-5p表达的调控作用

Fig. 3 The regulative effect of FOXD2-AS1 on miR-185-5p expression

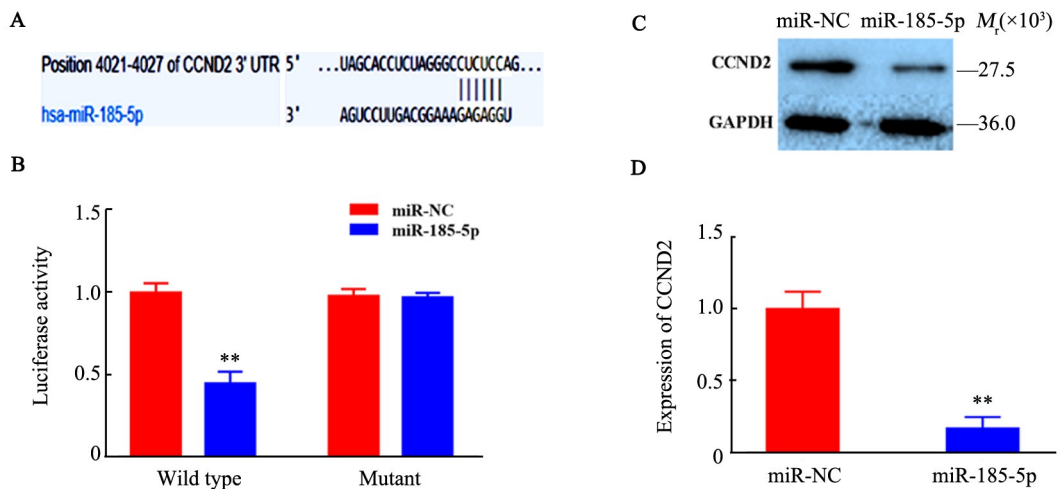


\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NC group or miR-185-5p mimics+pcDNA-FOXD2-AS1

A: Proliferation viability of MGC-803/AP cells was detected by CCK-8 assay; B and D: The invasion capability of MGC-803/AP cells was measured by Transwell assay ( $\times 100$ ); C and E: The apoptotic rate MGC-803/AP cells was detected by flow cytometer assay

图4 过表达 miR-185-5p 对 MGC-803/AP 细胞生物学行为的影响

Fig. 4 Effect of miR-185-5p over-expression on biological behaviors of MGC-803/AP cells



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs miR-NC group

A: The bioinformatics analysis result showed that miR-185-5p had a binding site in *CCND2*; B: The luciferase activity in *CCND2*-wt cells transfected with miR-185-5p was lower than that in NC group detected by dual-luciferase reporter assay; C-D: The expression of *CCND2* was measured by western blotting

图5 *CCND2* 是 miR-185-5p 的靶基因

Fig.5 *CCND2* was a target gene of miR-185-5p

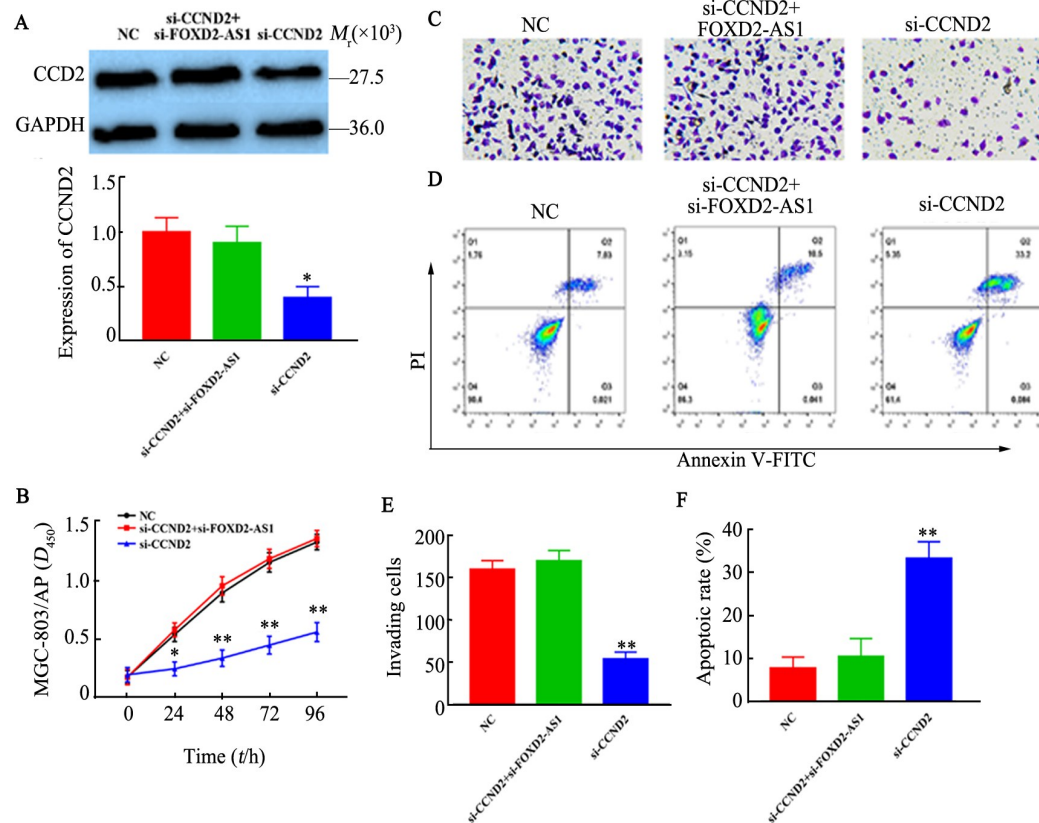
2.6 FOXD2-AS1 通过 miR-185-5p/CCND2 分子轴对 MGC-803/AP 细胞生物学的影响

Western blotting 检测结果显示, 沉默 CCDN2 可

显著抑制 CCDN2 的表达, 而同时沉默 FOXD2-AS1 和 CCND2 可显著恢复 CCND2 的表达 ( $P < 0.05$ , 图 6A)。CCK-8 和 Transwell 检测结果共同证实(图 6B,

C和E), 相比于对照组, 转染 si-CCND2 后可以显著抑制细胞增殖活力和侵袭能力 ( $P < 0.01$ )。但是, 相比于仅转染 si-CCND2 组, 同时沉默 FOXD2-AS1 和 CCND2 的表达后可以显著恢复 si-CCND2 对 MGC-803/AP 细胞增殖和侵袭能力的抑制作用 ( $P < 0.01$ )。同时, 流式细胞仪检测结果进一步证实(图 6D, F), 转染 si-CCND2 可显著促进细胞凋亡 ( $P < 0.001$ ), 而同时

转染 si-FOXD2-AS1 和 si-CCND2 可以显著下调 si-CCND2 对 MGC-803/AP 细胞凋亡促进作用 ( $P < 0.001$ )。由此可知, FOXD2-AS1 通过下调 miR-185-5p 对 CCND2 的抑制作用, 进而促进胃癌 MGC-803/AP 细胞增殖、侵袭和抑制细胞凋亡的作用, 从而上调 MGC-803/AP 细胞对阿帕替尼的耐药性。



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NC group or si-FOXD2-AS1+si CCND2 group

A: The expression of CCND2 was detected by Western blotting; B: The cell proliferation of MGC-803/AP cells was measured by CCK-8 assay; C and E: The invasion capability of MGC-803/AP cells was measured by Transwell assay( $\times 100$ ); D and F: The percentage of apoptotic MGC-803/AP cells was detected by flow cytometer assay

图 6 FOXD2-AS1 通过 miR-185-5p/CCND2 分子轴影响 MGC-803/AP 细胞的生物学行为

Fig. 6 FOXD2-AS1 modulates biological behaviors of MGC-803/AP cells via regulating miR-185-5p/CCND2 axis

### 3 讨论

胃癌是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤, 在我国各种恶性肿瘤中发病率居首位, 胃癌发病有明显的地域性差别, 在我国的西北与东部沿海地区胃癌发病率比南方地区明显为高。好发年龄在 50 岁以上, 男女发病率之比为 2:1。目前, 临床上着重于应用早期诊断和辅助化疗(如顺氯氨铂、卡铂、长春花碱和紫杉醇)来延长胃癌患者的生存期。然而, 由于胃癌细胞对化疗药物存在耐受性, 所以预期疗效无法达到<sup>[10-11]</sup>。近年来, lncRNA 已被证实在肿瘤的发生发

展进程和耐药中发挥了重要调节作用<sup>[12-13]</sup>。然而, 目前 lncRNA 在胃癌多药耐药中的作用尚不清楚。因此, 迫切需要寻找胃癌中调控耐药性的相关基因的上游关键分子, 并深入研究其分子机制, 进一步为胃癌临床治疗耐药性提供更多的依据。

近年来, 研究人员在结构性非编码 RNA 和各类小 RNA (miRNA) 之外, 还发现了一类长度大于 200 个核苷酸的 lncRNA。lncRNA 虽普遍含有一定的保守序列, 但其调控基因表达的方式多种多样, 包括表观遗传调控, 转录调控和转录后调控等。总而言之, lncRNAs 通过参与 X 染色体沉默, 基因组印迹和

DNA 损伤应答等多种生物学机制来调控胃癌、甲状腺癌、结肠癌及肝癌等肿瘤疾病的发生发展及化疗药物耐药过程<sup>[14]</sup>。近期有文献报道, lncRNA MT1JP<sup>[15]</sup>、lncRNA AFAP1<sup>[16]</sup>、lncRNA SNHG8<sup>[17]</sup>均对胃癌细胞增殖、迁移及上皮间质转化有显著影响,提示 lncRNA 可能与胃癌的发生发展密切相关。但是,对于 lncRNA FOXD2-AS1 在胃癌细胞对阿帕替尼耐药性的分子机制尚未报道。

同时,近年来的研究发现,miRNAs 的异常调节被认为是包括胃癌在内的多种疾病发生发展的关键因素。例如,miR-185-5p 通过下调 TRIM29 的表达进而抑制胃癌细胞增殖和迁移<sup>[18]</sup>。TAN 等人<sup>[19]</sup>证实,miR-185-5p 可作为一个独立的胃癌预后标记物。同时,也有研究表明 miR-185-5p 对肺癌<sup>[20]</sup>、结直肠癌<sup>[21]</sup>、胰腺癌<sup>[22]</sup>和肝癌<sup>[23]</sup>等肿瘤细胞的增殖、迁移和上皮间质转化均有显著影响。然而,未见有相关文献报道 miR-185-5p 对胃癌影响的作用机制。

根据生物信息工具预测 CCND2 (cyclin D2) 是 miR-185-5p 的可能靶基因。CCND2 作为细胞周期家族中的一员,它的异常表达可能导致细胞的异常增殖。研究发现,CCND2 在多种肿瘤组织中存在异常表达,如宫颈癌<sup>[24]</sup>、胃癌<sup>[25]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[26]</sup>和前列腺癌<sup>[27]</sup>等。同时,HUANG 等人<sup>[28]</sup>报道,miR-615 通过靶向下调 CCND2 抑制前列腺癌细胞增殖和侵袭。此外,miR-1297<sup>[29]</sup>、miR-154<sup>[30]</sup>和 miR-497<sup>[31]</sup>均被报道靶向下调 CCND2 抑制肿瘤细胞增殖和迁移能力。为此,本研究推测 miR-185-5p 可能通过靶向调控 CCND2 介导胃癌细胞的增殖和侵袭能力。

本研究发现 FOXD2-AS1 在胃癌组织、细胞系和耐药细胞 MGC-803/AP 中高表达。过表达 FOXD2-AS1 可显著促进 MGC-803/AP 细胞增殖、侵袭和抑制凋亡作用。同时,双荧光素酶报告基因证实 FOXD2-AS1 可靶向负调控 miR-185-5p 的表达,且 miR-185-5p 可以结合 CCND2 的 3' UTR,并负调控 CCND2 的表达。进一步实验发现,FOXD2-AS1 通过下调 miR-185-5p 对 CCND2 的抑制作用,进而促进胃癌 MGC-803/AP 细胞增殖、侵袭和抑制细胞凋亡的作用,从而上调 MGC-803/AP 细胞对阿帕替尼的耐药性。

## [参考文献]

- [1] FITZMAURICE C, ALLEN C, BARBER R M, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study[J]. JAMA Oncol, 2017, 3(4):524-548. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.5688.
- [2] JIANG L, YANG W, BIAN W, et al. microRNA-623 targets cyclin D1 to inhibit cell proliferation and enhance the chemosensitivity of cells to 5-fluorouracil in gastric cancer[J]. Oncol Res, 2018. DOI: 10.3727/096504018x15193469240508.
- [3] CAO W, WEI W, ZHAN Z, et al. Regulation of drug resistance and metastasis of gastric cancer cells via the microRNA647-ANK2 axis [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4):1958-1966. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3381.
- [4] WANG Z, JI F. Downregulation of microRNA-17-5p inhibits drug resistance of gastric cancer cells partially through targeting p21[J]. Oncol Lett, 2018, 15(4): 4585-4591. DOI: 10.3892/ol.2018.7822.
- [5] WANG X, ZHANG H, BAI M, et al. Exosomes serve as nanoparticles to deliver anti-miR-214 to reverse chemoresistance to cisplatin in gastric cancer[J]. Mol Ther, 2018, 26(3): 774-783. DOI: 10.1016/j.yimthe.2018.01.001.
- [6] WANG L, MA L, XU F, et al. Role of long non-coding RNA in drug resistance in non-small cell lung cancer[J]. Thorac Cancer, 2018, 9(7): 761-768. DOI: 10.1111/1759-7714.12652.
- [7] AN J, LV W, ZHANG Y. LncRNA NEAT1 contributes to paclitaxel resistance of ovarian cancer cells by regulating ZEB1 expression via miR-194[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 5377-5390. DOI: 10.2147/ott.s147586.
- [8] CHENG C, QIN Y, ZHI Q, et al. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR inhibits cisplatin resistance of gastric cancer cells through inhibiting the PI3K/Akt and Wnt/beta-catenin signaling pathways by up-regulating miR-34a[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 107(Pt B): 2620-2629. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.154.
- [9] WANG Y, WU K, YANG Z, et al. Multidrug-resistance related long non-coding RNA expression profile analysis of gastric cancer[J/OL]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135461[2018-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4546299/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0135461.
- [10] GUO X F, LIU J P, MA S Q, et al. Avicularin reversed multidrug-resistance in human gastric cancer through enhancing Bax and BOK expressions[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 67-74. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.110.
- [11] XU W, SHI Q, QIAN X, et al. Rab5a suppresses autophagy to promote drug resistance in cancer cells[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(4): 1229-1236.
- [12] CHEN Q N, WEI C C, WANG Z X, et al. Long non-coding RNAs in anti-cancer drug resistance[J]. Oncotarget, 2017, 8(1): 1925-1936. DOI: 10.18632/oncotarget.12461.
- [13] WANG Y, ZHANG D, WU K, et al. Long noncoding RNA MRUL promotes ABCB1 expression in multidrug-resistant gastric cancer cell sublines[J]. Mol Cell Biol, 2014, 34(17): 3182-3193. DOI: 10.1128/MCB.01580-13.
- [14] ASKARIAN-AMIRI M E, LEUNG E, FINLAY G, et al. The regulatory role of long noncoding RNAs in cancer drug resistance[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1395: 207-227. DOI: 10.1007/978-1-4939-3347-1\_12.
- [15] XU Y, ZHANG G, ZOU C, et al. LncRNA MT1JP suppresses gastric cancer cell proliferation and migration through MT1JP/MiR-214-3p/RUNX3 axis[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(6):2445-2459. DOI: 10.1159/000489651.
- [16] YE F, GONG Y, CHEN X, et al. Long noncoding AFAP1-antisense RNA 1 is upregulated and promotes tumorigenesis in gastric cancer



- [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5):7523-7530. DOI: 10.3892/ol.2018.8266.
- [17] LIU J, YANG C, GU Y, et al. Knockdown of the lncRNA SNHG8 inhibits cell growth in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2018, 23: 17. DOI: 10.1186/s11658-018-0070-8.
- [18] QIU F, XIONG J P, DENG J, et al. TRIM29 functions as an oncogene in gastric cancer and is regulated by miR-185[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 5053-5061.
- [19] TAN Z, JIANG H, WU Y, et al. miR-185 is an independent prognosis factor and suppresses tumor metastasis in gastric cancer[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 386(1/2): 223-231. DOI: 10.1007/s11010-013-1860-y.
- [20] ZHAO L, ZHANG Y, LIU J, et al. MiR-185 inhibits cell proliferation and invasion of non-small cell lung cancer by targeting KLF7[J/OL]. *Oncol Res*, 2018 [Epub ahead of print]. [2018-07-05]. [https://www.ingentaconnect.com/content/cog/or/pre-prints/content-orm-a-1929\\_zhao#](https://www.ingentaconnect.com/content/cog/or/pre-prints/content-orm-a-1929_zhao#). DOI: 10.3727/096504018X15247341491655.
- [21] ZHANG W, SUN Z, SU L, et al. miRNA-185 serves as a prognostic factor and suppresses migration and invasion through Wnt1 in colon cancer[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 825: 75-84. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.02.019.
- [22] XIA D, LI X, NIU Q, et al. MicroRNA-185 suppresses pancreatic cell proliferation by targeting transcriptional coactivator with PDZ-binding motif in pancreatic cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1): 657-666. DOI: 10.3892/etm.2017.5447.
- [23] LIN Z, HE R, LUO H, et al. Integrin-beta5, a miR-185-targeted gene, promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis by regulating beta-catenin stability[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 17. DOI: 10.1186/s13046-018-0691-9.
- [24] DU X, LIN L I, ZHANG L, et al. microRNA-195 inhibits the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells via the inhibition of CCND2 and MYB expression[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(4): 2639-2643. DOI: 10.3892/ol.2015.3541.
- [25] SHI H, HAN J, YUE S, et al. Prognostic significance of combined microRNA-206 and CyclinD2 in gastric cancer patients after curative surgery: a retrospective cohort study[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 71: 210-215. DOI: 10.1016/j.biopha.2014.12.037.
- [26] LI Y L, WANG J, ZHANG C Y, et al. MiR-146a-5p inhibits cell proliferation and cell cycle progression in NSCLC cell lines by targeting CCND1 and CCND2[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(37): 59287-59298. DOI: 10.18632/oncotarget.11040.
- [27] CHEN Y, ZHANG Q, WANG Q, et al. Genetic association analysis of the RTK/ERK pathway with aggressive prostate cancer highlights the potential role of CCND2 in disease progression[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4538. DOI: 10.1038/s41598-017-04731-4.
- [28] HUANG F, ZHAO H, DU Z, et al. MiR-615 inhibits prostate cancer cell proliferation and invasion by directly targeting Cyclin D2[J]. *Oncol Res*, 2018 [Epub ahead of print]. DOI: 10.3727/096504018x15190399381143.
- [29] WANG Y, XUE J, KUANG H, et al. microRNA-1297 inhibits the growth and metastasis of colorectal cancer by suppressing cyclin D2 expression[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(11): 991-999. DOI: 10.1089/dna.2017.3829.
- [30] ZHU C, SHAO P, BAO M, et al. miR-154 inhibits prostate cancer cell proliferation by targeting CCND2[J/OL]. *Urol Oncol*, 2014, 32(1): 31. e9-16[2018-07-06]. [https://www.urologiconcology.org/article/S1078-1439\(12\)00406-1/fulltext](https://www.urologiconcology.org/article/S1078-1439(12)00406-1/fulltext). DOI: 10.1016/j.urolonc.2012.11.013.
- [31] ZHONG H, YANG J, ZHANG B, et al. LncRNA GACAT3 predicts poor prognosis and promotes cell proliferation in breast cancer through regulation of miR-497/CCND2[J]. *Cancer Biomark*, 2018, 22(4): 787-797. DOI: 10.3233/cbm-181354.

[收稿日期] 2018-08-30

[修回日期] 2018-09-30

[本文编辑] 韩丹,阮芳铭