

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.11.010

· 临床研究(专题) ·

## miR-29c 通过 *TNRC18* 调控胃癌组织和细胞阿帕替尼耐药的机制

陈志刚, 卢宏达, 唐求(华中科技大学 同济医学院 武汉市中心医院 肿瘤科, 武汉 湖北 430030)

**[摘要]** **目的:**探讨 miR-29c 调控 *TNRC18* 胃癌组织和细胞阿帕替尼耐药性的机制。**方法:**收集 2015 年 2 月至 2017 年 10 月武汉市中心医院具有完整资料的 39 例胃癌和癌旁组织标本(其中 21 例为阿帕替尼耐药患者、18 例为不耐药患者),采用 qRT-PCR 检测 miR-29c 在胃癌组织和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 miR-29c 过表达/敲降对 MGC-803/AP 耐药细胞增殖、侵袭和凋亡影响, Western blotting 检测 miR-29c 调控 *TNRC18* 表达, 双荧光素酶报告基因验证 miR-29c 与 *TNRC18* 的靶向作用关系。**结果:**miR-29c 在 3 种胃癌细胞系和阿帕替尼耐药癌患者组织中均低表达。双荧光素酶报告基因证实 miR-29c 靶向作用 *TNRC18* 并下调其表达水平。miR-29c 通过靶向下调 *TNRC18* 抑制阿帕替尼耐药的 MGC-803/AP 细胞的增殖、侵袭并促进细胞凋亡(均  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 进而降低胃癌细胞 MGC-803/AP 对阿帕替尼的耐药性。体内实验同样证实, miR-29c 通过靶向抑制 *TNRC18* 降低胃癌对阿帕替尼的耐药性。**结论:**miR-29c/*TNRC18* 分子轴在胃癌组织和细胞 MGC-803/AP 对阿帕替尼耐药中发挥着一定作用, 过表达 miR-29c 可逆转 MGC-803/AP 细胞对阿帕替尼耐药。

**[关键词]** 胃癌; MGC-803 细胞; 阿帕替尼; miR-29c; *TNRC18*; 耐药性

**[中图分类号]** R735.2; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)11-1140-08

## miR-29c modulates apatinib resistance in gastric cancer tissues and cell via targeting *TNRC18*

CHEN Zhigang, LU Hongda, TANG Qiu (Department of Oncology, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mechanism of miR-29c modulating apatinib resistance of gastric cancer tissues and cells MGC-803 via regulating *TNRC18*. **Methods:** A total of 39 gastric cancer patients with complete clinical data, who were treated in the Central Hospital of Wuhan from Feb. 2015 to Oct. 2017, were collected for this study. The expression of miR-29c was detected by qRT-PCR in gastric cancer tissues and cell lines. The effect of miR-29c over-expression/knockdown on the proliferation, invasion and apoptosis of MGC-803/AP cells *in vitro* was measured by CCK-8 assay, Transwell and Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry assay. Western blotting was used to detect the regulation of miR-29c on *TNRC18*. Moreover, the relationship between miR-29c and *TNRC18* was examined by dual luciferase reporter gene assay. **Results:** qRT-PCR revealed that miR-29c was low expressed in gastric cancer cell lines and gastric cancer tissues from patients resistant to apatinib. Moreover, dual luciferase reporter gene assay confirmed that miR-29c directly binds to the 3' UTR of *TNRC18* mRNA to suppress its expression in MGC-803/AP cells. Furthermore, miR-29c inhibited the apatinib resistance in gastric cancer MGC-803/AP cells via inhibiting cell proliferation, invasion and promoting cell apoptosis by targeted down-regulating *TNRC18*. Additionally, *in vivo* experiment also confirmed that miR-29c modulated apatinib-resistance in gastric cancer cells by targeted inhibiting *TNRC18*. **Conclusion:** miR-29c/*TNRC18* axis plays a certain role in the resistance of gastric cancer tissues and MGC-803/AP cells to apatinib, and over-expression of miR-29c may reverse the resistance of MGC-803/AP cells to apatinib.

**[Key words]** gastric cancer; MGC-803 cell; apatinib; miR-29c; *TNRC18*; drug resistance

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(11): 1140-1147. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.11.010]

胃癌是人类常见的消化道恶性肿瘤。国家癌症中心最新数据显示,我国胃癌居恶性肿瘤病死率第二位,严重威胁我国人民的健康甚至生命<sup>[1]</sup>。目前,临床上着重于应用早期诊断和辅助化疗(如卡培他滨、顺铂、紫杉醇和吉西他滨等)来延长胃癌患者的生存期<sup>[2-4]</sup>。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。研究<sup>[5]</sup>发现, microRNA(miRNA)与多

种肿瘤细胞耐药性密切相关。例如 miR-939 通过下调 *SLC34A2* 并激活 Raf/MEK/ERK 信号通路抑制胃癌细胞耐药性。WANG 等<sup>[6]</sup>研究发现, miR-524-5p 通过靶向下

**[作者简介]** 陈志刚(1970-),男,主治医师,主要从事肿瘤的基础和临床研究, E-mail: czqx88@sina.com

**[通信作者]** 卢宏达(LU Hongda, corresponding author), 博士,教授,主要从事肿瘤的基础和临床研究, E-mail: phlonda@163.com

调 *SOX9* 促进胃癌细胞对顺氯铂耐药性进而抑制胃癌肿瘤增殖和转移。同时,有研究<sup>[7-9]</sup>报道,miR-29c 作为抑癌基因,通过抑制胃癌细胞增殖、侵袭和促进细胞凋亡进而抑制胃癌发生发展进程。然而,miR-29c 通过调控 *TNRC18* 介导胃癌细胞阿帕替尼耐药性的分子作用机制尚未有相关文献报道。为此,本研究拟探讨 miR-29c 调控胃癌细胞阿帕替尼耐药性的分子机制,这对于揭示胃癌发生发展机制以及改善胃癌的诊断和治疗具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本及主要试剂

收集 2015 年 2 月至 2017 年 10 月间我院收治的资料完整的胃癌 39 例,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)经纤维胃镜、X 线钡餐、螺旋 CT 与正电子发射成像检查结果确认为胃癌;(2)手术前 2 周末进行放疗或化疗等治疗。排除标准:(1)手术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,本研究经华中科技大学同济医学院武汉市中心医院伦理委员会批准。

miR-29c 和 *TNRC18* 的 siRNAs 和 mimics 购自上海吉玛公司,DMEM 和 FBS 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,Lipofectamine™ 2000 和逆转录试剂盒均购自日本 TaKaRa 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,Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物有限公司,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,酶标仪、荧光定量 PCR 仪及电泳仪和凝胶成像系统均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.2 细胞和实验动物

人胃癌细胞株(MGC-803、HGC-27 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。实验用 SPF 级 BALB/c 裸鼠购自中国科学院昆明动物研究所,4~5 周龄,体质量(15±3)g。

### 1.3 胃癌耐药细胞株 MGC-803/AP 的建立

将对数生长期 MGC-803 细胞,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,若无明显死亡选择该对数期细胞增加阿帕替尼浓度,反复传代培养,直至最后在 1.0 μg/ml 阿帕替尼质量浓度下能够稳定存活,即为 MGC-803/AP 细胞。

### 1.4 MGC-803/AP 癌细胞转染 miR-29c inhibitor 和 TNRC18 siRNA

选取对数生长期的 MGC-803/AP 细胞,采用胰酶消化后,再利用 DMEM 培养基调整浓度为 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 miR-29c inhibitor 和 TNRC18 siRNA 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。

### 1.5 qRT-PCR 检测组织标本和细胞中 miR-29c 和 TNRC18 mRNA 水平

收集胃癌组织样本、转染后 48 h 的 MGC-803/AP 细胞和小鼠移植瘤组织,并采用 TRIzol 一步法分别提取组织和细胞中总 RNA,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 β-actin 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 μl)。PCR 热循环参数为:95 °C 5 min,然后 3 步反应:94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,进行 45 个循环。检测结果采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行计算。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequence for qRT-PCR

Primer	Sequence
U6	F: 5'-GAGGCACAGCGGAACG-3' R: 5'-CTACCACATAGTCCAGG-3'
β-actin	F: 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3' R: 5'-GCTGTCACCTTACCGTTCC-3'
miR-29c	F: 5'-CGCGCCTTTACACAGGC-3' R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
TNRC18	F: 5'-CAGCTGTGCTCCTAACGGC-3' R: 5'-GTGAGGAAGGTGATCACTG-3'

### 1.6 Western blotting 检测组织和细胞中相关蛋白的表达水平

提取蛋白后以 SDS-PAGE 分离蛋白、转膜。蛋白密封于 5% 牛血清蛋白中维持 1 h,再加入一抗,4 °C 下过夜。洗膜 3 次,每次 5 min,随后加入二抗,室温中 1 h。洗膜 3 次,加入发光试剂显影蛋白。β-actin 用作内参,以 Image J 软件分析靶带灰度水平。

### 1.7 CCK-8 实验检测相关癌细胞的增殖活力

将处于对数生长期的胃癌细胞接种于 96 孔板,

每孔含细胞 $1 \times 10^4$ 个、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, 培养箱内孵育1~4 h 后用酶标仪测定在 $450 \text{ nm}$ 处的 $D$ 值。

### 1.8 Transwell 实验检测相关癌细胞的侵袭能力

选择转染细胞为实验组、未转染为对照组, 分别将各组细胞用胰酶消化处理后接种于Transwell小室24孔板内, 上室加 $100 \mu\text{l}$  (密度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ ) 细胞悬液, 下室加 $250 \mu\text{l}$  含10%FBS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并计数细胞。

### 1.9 流式细胞术检测癌细胞的凋亡情况

选取对数生长期的MGC-803和MGC-803/AP细胞, PBS清洗2次。细胞与 $500 \mu\text{l}$  预冷的 $1 \times$ 结合缓冲液、 $5 \mu\text{l}$  Annexin-V-FITC 混合后室温避光孵育15 min, 上机前5 min再加入 $2.5 \mu\text{l}$  PI染色, 之后上机检测MGC-803/AP细胞的凋亡情况。其中, 散点图的第四象限(Q4)代表健康的成活细胞(FITC<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), 第三象限(Q3)代表早期凋亡细胞(FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), 第二象限(Q2)代表晚期凋亡细胞(FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>)。细胞凋亡率=早期凋亡率(Q3)+晚期凋亡率(Q2)。

### 1.10 双荧光素酶报告基因验证 miR-29c 与 TNRC18 靶向作用关系

将MGC-803/AP细胞转染并表达miR-29c前体, 按试剂盒说明书小心操作。并于 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱中培养48 h后, 收集细胞。然后采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒对上述收集的细胞进行检测, 设置3个重复样本。

### 1.11 免疫组化二步法检测胃癌组织中 TNRC18 的表达

取小鼠胃癌肿瘤组织切片于 $58^\circ\text{C}$ 烤片, 脱蜡、脱水, 蒸馏水洗3次; 抗原修复, 3%双氧水去除内源性过氧化酶; 血清封闭, 加一抗 $4^\circ\text{C}$ 过夜孵育, PBS清洗, 加二抗常温孵育30 min, PBS清洗3次, 加DAB显色剂, 苏木精复染, 乙醇脱水, 封片, 荧光显微镜(400倍)下观察拍照。TNRC18蛋白以胞质内出现棕黄色颗粒(DAB显色)为阳性显色。

染色评分标准判定: 综合考虑切片中阳性细胞占所观察同类细胞数的百分比和阳性细胞着色强度两项指标, 半定量判定结果。根据显色程度判断阳性程度: 标本无染色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。根据阳性细胞在观察细胞中所占比例分为: 阳性细胞数 $< 10\%$ 为0分,  $10\% \sim 50\%$ 为1分,  $51\% \sim 75\%$ 为2分,  $> 75\%$ 为3分。再按这两项指标的评分之和将结果分成4级: 0~3分为阴性(-),

4~6分为表达阳性(+), 7~9分为表达强阳性(++); 其中“+”~“++”为阳性表达。

### 1.12 移植瘤模型的建立

将转染后MGC-803/AP细胞调整密度为 $5 \times 10^7$ 个/ml, 将 $0.1 \text{ ml}$ 细胞悬液接种于小鼠左腋下, 每组小鼠10只。肿瘤长至 $0.25 \text{ cm}$ 左右时给药, 阿帕替尼 $40 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 连续5 d。每隔3 d用游标卡尺测量肿瘤最大直径和最小直径, 并计算肿瘤体积, 干预结束后脱臼处死小鼠, 分离皮下肿瘤, 取瘤组织检测TNRC18的表达水平。

### 1.13 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行统计分析。有关实验均重复3次, 计算数据以 $\bar{x} \pm s$ 表达, 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 $P < 0.01$ 的差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-29c 在阿帕替尼耐药胃癌患者组织中的表达水平低于不耐药患者

qRT-PCR检测结果(图1)表明, miR-29c在阿帕替尼耐药患者(21例)组织中的表达水平明显低于不耐药患者(18例)( $P < 0.01$ )。说明miR-29c表达水平可能与胃癌患者阿帕替尼耐药性有关。

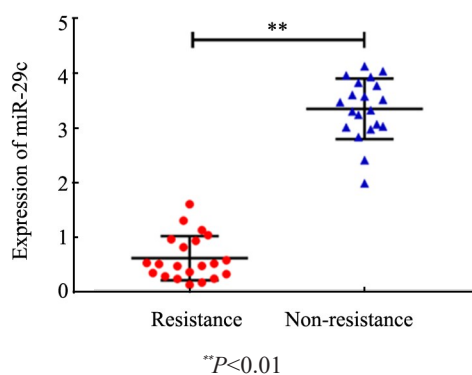


图1 miR-29c在胃癌组织中的表达水平

Fig.1 Expression of miR-29c in gastric cancer tissues

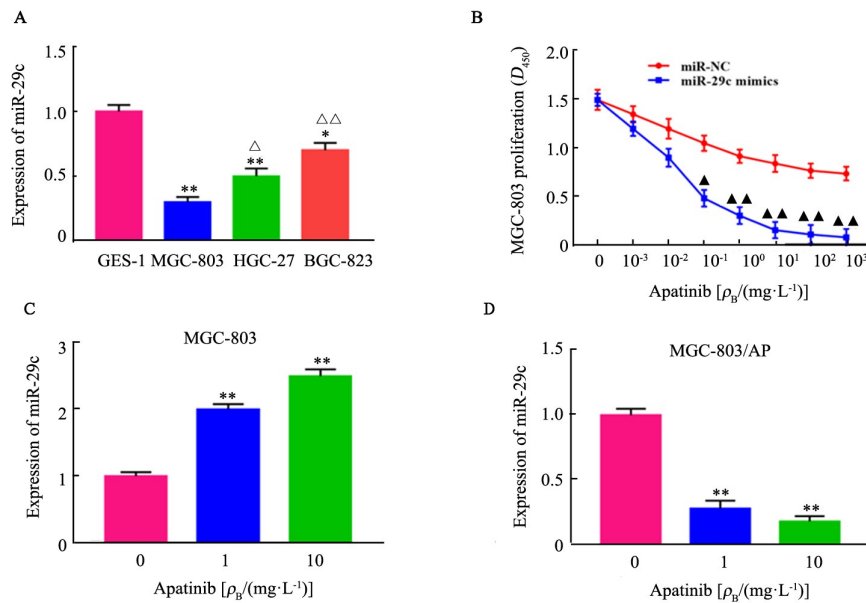
### 2.2 阿帕替尼对胃癌细胞系中 miR-29c 表达水平的影响

qRT-PCR检测结果(图2A)显示, miR-29c在胃癌细胞系中的表达水平明显低于人胃黏膜细胞GES-1(均 $P < 0.05$ ), 且MGC-803胃癌细胞的表达水平最低( $P < 0.05$ )。

CCK-8检测结果(图2B)表明, 在MGC-803细胞中过表达miR-29c后, 随阿帕替尼质量浓度的递增显著抑制了MGC-803细胞增殖活力( $P < 0.05$ ), 在浓度为1和 $10 \text{ mg/L}$ 的阿帕替尼作用下与对照组存在显著

差异,且转染 miR-29c mimics 的 MGC-803 细胞的存活率仅为 15% 和 5%。同时,  $1 \times 10^2$  和  $1 \times 10^3$  mg/L 的阿帕替尼对 MGC-803 细胞增殖的抑制率与 10 mg/L 的阿帕替尼相当。基于此,选择阿帕替尼作用质量浓度为 1.0 和 10 mg/L 作用 MGC-803 和 MGC-803/AP 细胞,观察细胞中 miR-29c 表达水平的影响。qRT-PCR

检测结果显示,1 和 10 mg/L 阿帕替尼显著促进了 MGC-803 细胞中 miR-29c 的表达水平 ( $P < 0.01$ , 图 2C),但明显抑制了 MGC-803/AP 细胞中 miR-29c 的表达 ( $P < 0.01$ , 图 2D)。由此可知,阿帕替尼通过促进 miR-29c 的表达抑制胃癌细胞增殖活力。



A: The miR-29c was over-expressed in gastric cancer cell lines by qRT-PCR  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs GES-1 cells;  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$  vs MGC-803 cells; B: The cell viability was detected by CCK-8 assay  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$  vs miR-NC group; C-D: The cells were treated with apatinib (1 and 10 mg/L) for 48 h and the expression of miR-29c was detected by qRT-PCR  $^{**}P < 0.01$  vs 0 mg/L group

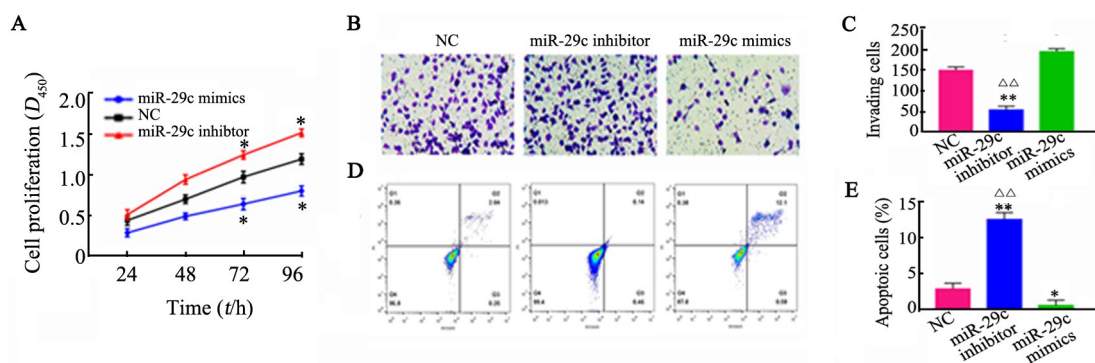
图 2 阿帕替尼对 miR-29c 在胃癌细胞中表达水平的影响

Fig. 2 Effect of apatinib on miR-29c expression in gastric cancer cells

### 2.3 过表达 miR-29c 显著抑制胃癌 MGC-803/AP 细胞增殖、侵袭和促进凋亡

CCK-8 检测结果(图 3A)显示,过表达 miR-29c 可以显著抑制 MGC-803/AP 细胞的增殖活力 ( $P < 0.05$ ),而敲降 miR-29c 较空白组显著促进了 MGC-803/AP 细胞的增殖活力 ( $P < 0.05$ )。同时,流式细胞仪检测结果(图 3B、E)表明,过表达 miR-29c 可显著

促进 MGC-803/AP 细胞凋亡,敲降 miR-29c 可显著抑制 MGC-803/AP 细胞凋亡 ( $P < 0.01$ )。此外,Transwell 检测结果(图 3C、D)同样证实,过表达 miR-29c 可显著抑制 MGC-803/AP 细胞侵袭能力,敲降 miR-29c 可显著促进 MGC-803/AP 细胞侵袭能力 ( $P < 0.01$ )。由此可知,过表达 miR-29c 可显著抑制胃癌 MGC-803/AP 细胞增殖、侵袭和促进细胞凋亡。



A: The cell proliferation was measured by CCK-8 assay; B, C: Transwell assay was performed to measure the cell invasion ability( $\times 100$ ); D, E: The rate of apoptosis was measured by flow cytometry  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs NC group;  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$  vs miR-29c mimics group

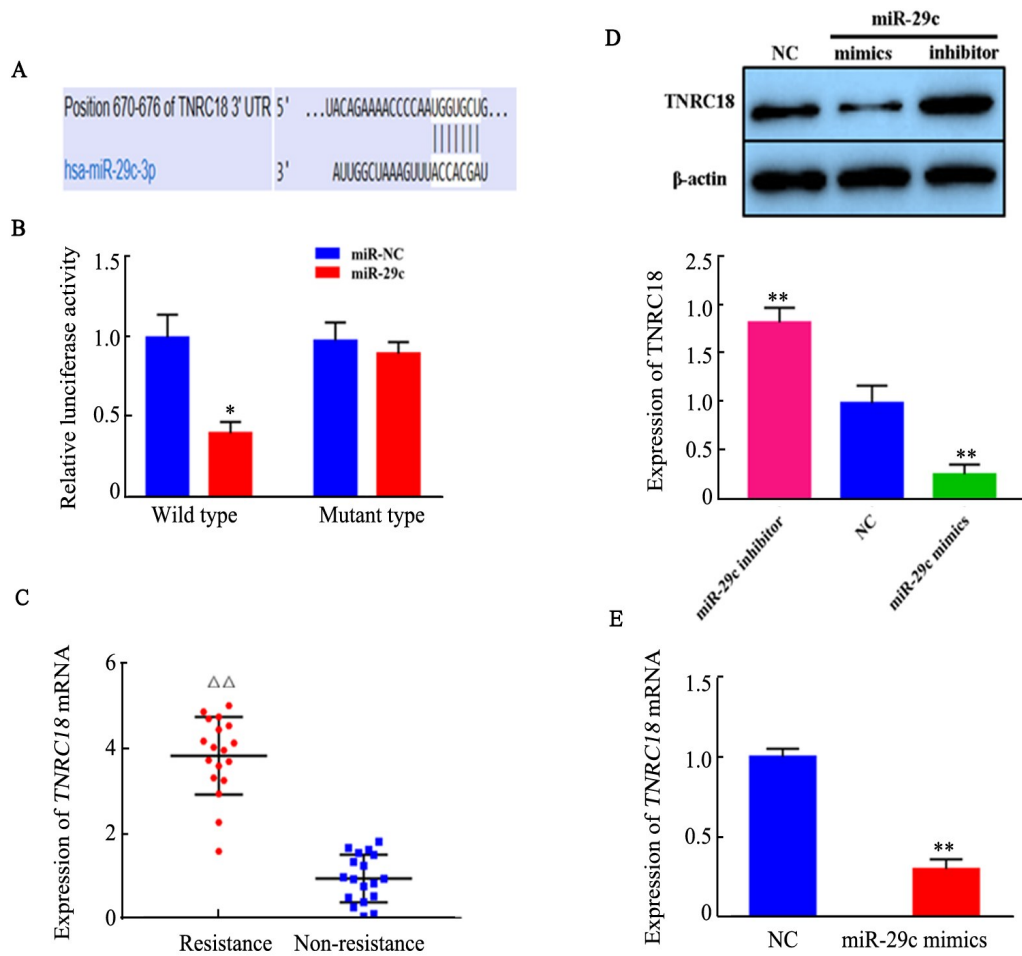
图 3 miR-29c 对胃癌 MGC-803/AP 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

Fig. 3 Effect of miR-29c on proliferation, invasion and apoptosis of MGC-803/AP cells

### 2.4 miR-29c对TNRC18表达的调控作用

借助生物信息学数据库 TargetScan、miRnada 和 PITA 对 miR-29c 的靶基因进行了预测,发现 *TNRC18* 是 miR-29c 的候选靶基因。随后采用荧光素酶报告基因验证实验发现,miR-29c 可以结合 *TNRC18* 的 3' UTR(图 4A),并且 miR-29c 可以负调控 *TNRC18* 的表达 ( $P<0.01$ , 图 4B)。采用 qRT-PCR 检测临床胃癌患者样本中 *TNRC18* 的表达水平,结果显示,*TNRC18* 在耐药患者组织中的表达水平高于对阿帕替尼敏感的

胃癌患者 ( $P<0.01$ , 图 4C)。同时,Western blotting 检测结果证实,过表达 miR-29c 可显著下调 *TNRC18* 的表达水平,而沉默 miR-29c 后可以显著上调 *TNRC18* 在 MGC-803/AP 中的表达水平 ( $P<0.01$ , 图 4D)。此外,qRT-PCR 检测结果显示,miR-29c 过表达后可抑制 *TNRC18* mRNA 表达水平 ( $P<0.01$ , 图 4E)。由此可知,*TNRC18* 是 miR-29c 的靶基因,并且 miR-29c 可负调控 *TNRC18* 的表达。



A: *TNRC18* was predicted to be a target of miR-29c by the online programs targetscan, miRnada and PITA; B: The luciferase activity in *TNRC18*-wt transfected with miR-29c was lower than that in NC group detected by dual-luciferase reporter assay; C: The expression of *TNRC18* mRNA was over-expressed in gastric cancer tissues from patients resistant to apatinib by qRT-PCR; D: Western blotting analysis showed that over-expression of miR-29c significantly inhibited *TNRC18* protein expression, whereas silencing of miR-29c promoted *TNRC18* expression; E: The expression of *TNRC18* mRNA was measured by qRT-PCR. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs NC group;

△△ $P<0.01$  vs non-resistance group

图4 *TNRC18* 是 miR-29c 的靶向调控基因

Fig. 4 *TNRC18* is the target gene of miR-29c

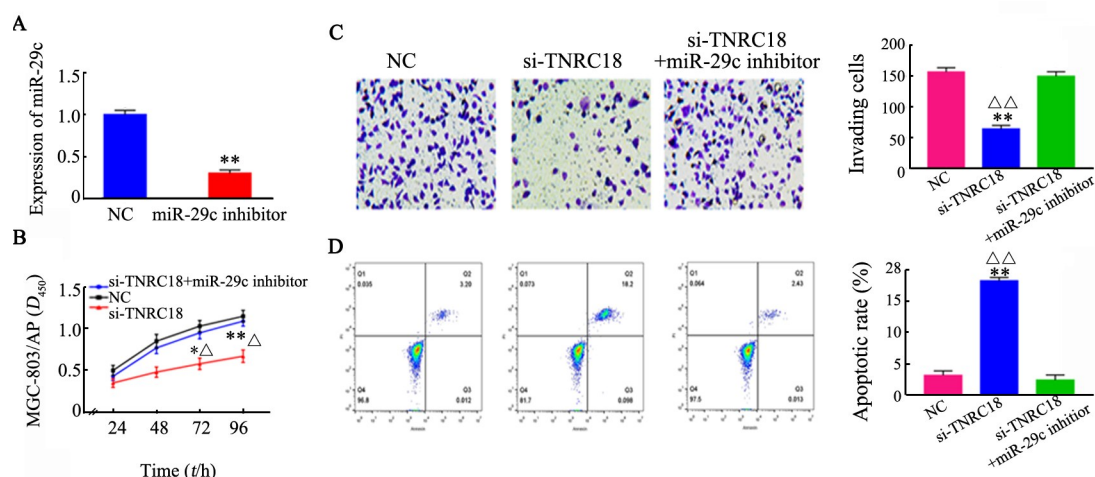
### 2.5 miR-29c/TNRC18 分子轴对 MGC-803/AP 细胞阿帕替尼耐药性的影响

qRT-PCR 检测结果(图 5A)显示,相比于对照组,在 MGC-803/AP 细胞中沉默 miR-29c 后可显著抑制 miR-29 的表达 ( $P<0.01$ )。CCK-8 检测结果(图 5B)证

实,敲降 *TNRC18* 的表达可以显著抑制 MGC-803/AP 细胞增殖活力 ( $P<0.05$ ),而同时沉默 miR-29c 和 *TNRC18* 的表达可以恢复 MGC-803/AP 细胞增殖活力 ( $P<0.05$ )。Transwell 检测结果(图 5C)表明,相比于对照组,转染 si-*TNRC18* 可显著抑制 MGC-803/AP 细

胞侵袭能力( $P<0.001$ ),而同时转染 miR-29c inhibitor 和 si-TNRC18 后其侵袭能力与对照组没有差异。流式细胞仪检测结果(图 5D)证实,转染 si-TNRC18 可以显著促进 MGC-803/AP 细胞凋亡( $P<0.01$ ),而同时

转染 miR-29c inhibitor 和 si-TNRC18 后与对照组没有显著差异。由此可知,miR-29c 靶向下调 *TNRC18* 后显著抑制 MGC-803/AP 细胞增殖、侵袭和促进细胞凋亡。



A: The expression of miR-29c was low expressed in miR-29c inhibitor group by qRT-PCR; B: CCK-8 assay showed that silencing of *TNRC18* inhibited the cell viability. C: The Transwell assay was performed to measure the cell invasion ability( $\times 100$ ); D: The apoptosis rate was measured by flow cytometry. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs NC group;  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$  vs co-transfected with miR-29c inhibitor and si-TNRC18 group

图5 miR-29c/*TNRC18* 分子轴对胃癌 MGC-803/AP 细胞阿帕替尼耐药性的影响

Fig. 5 Effect of miR-29c/*TNRC18* axis on the apatinib resistance of gastric cancer MGC-803/AP cells

## 2.6 miR-29c 对小鼠胃癌阿帕替尼耐药动物模型的影响

通过肿瘤生长曲线记录发现,在 MGC-803/AP 细胞株过表达 miR-29c 能够显著促进阿帕替尼对胃癌耐药小鼠模型的治疗效果,其移植瘤的生长速度明显低于转染对照组( $P<0.05$ ,图 6A 和 6B)。随后,随机选取 2 个肿瘤,提取蛋白,通过 Western blotting 和免疫组化检测瘤内 *TNRC18* 的表达水平。结果证实,转染 miR-29mimics 后显著抑制了 *TNRC18* 蛋白的表达水平( $P<0.01$ ,图 6C 和 6D)。由此可知,miR-29c 通过靶向下调 *TNRC18* 逆转胃癌阿帕替尼的耐药性。

## 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。同时,绝大多数胃癌属于腺癌,早期无明显症状,或出现上腹不适、嗝气等非特异性症状,常与胃炎、胃溃疡等胃慢性疾病症状相似,易被忽略,因此,目前我国胃癌的早期诊断率仍较低。目前,对于临床上主要以手术和化疗来延长胃癌患者的生存期。然而,由于胃癌细胞对化疗药

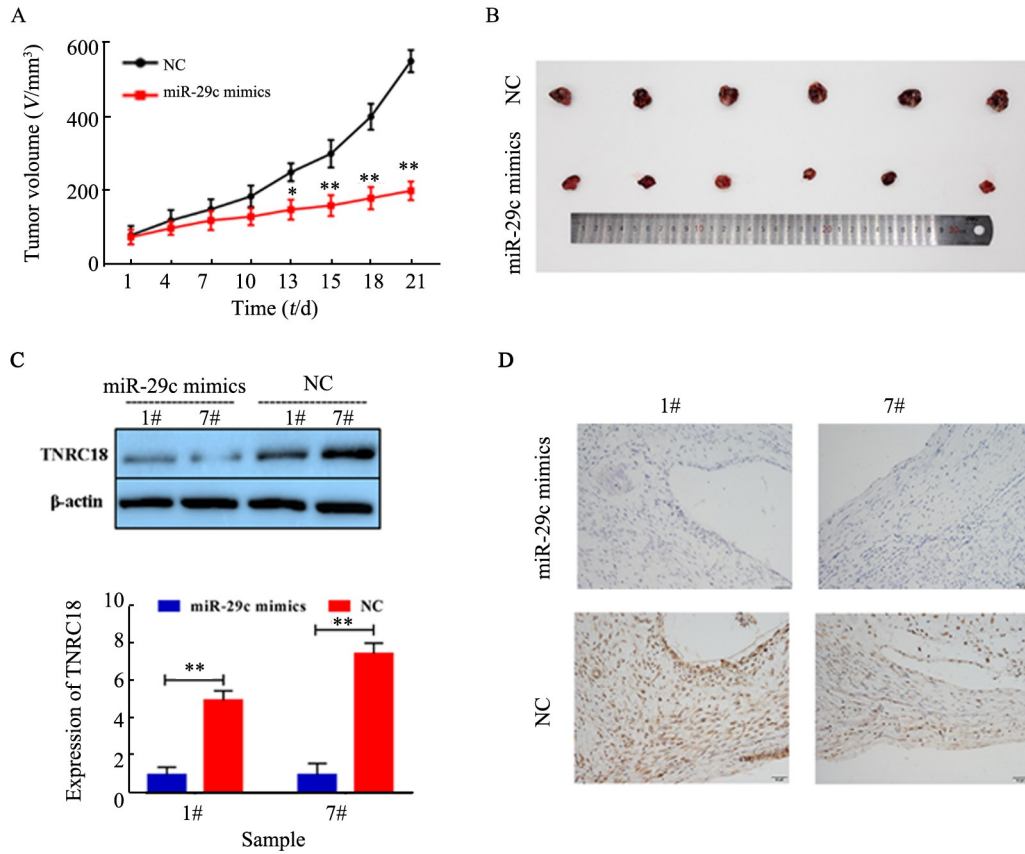
物存在耐受性,所以预期疗效无法达到。研究<sup>[10]</sup>表明,当癌细胞出现转移和侵袭的表型时,癌细胞内的分子变化会对化疗产生拮抗效应。近期研究发现,胃癌细胞对奥沙利铂<sup>[11]</sup>、顺氯氨铂<sup>[12]</sup>、阿帕替尼<sup>[13]</sup>、紫杉醇和 5-氟尿嘧啶<sup>[14]</sup>等化疗药物存在耐药性。但是,目前没有相关文献报道胃癌细胞对阿帕替尼耐药性的分子机制。

研究发现,miRNAs 的异常调节被认为是包括胃癌在内的多种肿瘤发生、发展的关键调节基因。例如,VIDAL 等<sup>[15]</sup>人报道,miR-29c 具有作为胃癌分子诊断标志物的潜能。研究表明,miR-29c 可调控黑色素瘤<sup>[16]</sup>、肺癌<sup>[17]</sup>和鼻咽癌<sup>[18]</sup>对化疗药物的敏感性,进而提升药物对肿瘤的作用效果。同时,HUANG 等<sup>[19]</sup>研究发现,miR-29c 通过靶向下调 USP22 介导胰腺癌自噬,进而增强胰腺癌的化疗效果。SUN 等<sup>[20]</sup>的研究结果证实,miR-29c 通过阻断 PI3K/Akt 信号通路促进顺铂对非小细胞肺癌的治疗效果。此外,生物信息工具预测 *TNRC18* 是 miR-29c 的可能靶向基因,但 *TNRC18* 是目前功能未定的基因。

综上所述,本研究揭示了 miR-29c 的异常表达与胃癌细胞增殖、侵袭凋亡密切相关。此外,miR-29c 通过靶向下调 *TNRC18* 促进 MGC-803/AP 细胞凋亡以及抑制细胞增殖和侵袭,进而增强胃癌 MGC-803/

AP细胞对阿帕替尼的敏感性。本研究将为寻找胃癌细胞阿帕替尼耐药性机制及其治疗方式提供了实验依据,未来的研究应该进一步确定miR-29c/TNRC18

介导的信号通路对胃癌耐药性的机制,需要进行大量的动物实验及临床样本研究来验证。



A: Curve of tumor growth; B: The tumor volume was measured with caliper; C: The expression of TNRC18 in tumor tissues was detected by Western blotting; D: The expression of TRNC18 in tumor tissues was measured by IHC( $\times 100$ )

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

图6 miR-29c对胃癌阿帕替尼耐药动物模型的影响

Fig. 6 Effect of miR-29c on apatinib resistance of gastric cancer in animal mode

[参考文献]

[1] YE P, SHI Y, LI A. Association between hMLH1 promoter methylation and risk of gastric cancer: a meta-analysis[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 368. DOI: 10.3389/fphys.2018.00368.

[2] SEO H S, SONG KY, JUNG YJ, et al. Radical gastrectomy after chemotherapy may prolong survival in stage IV gastric cancer: a korean multi-institutional analysis[J]. *World J Surg*, 2018, 42(10): 3286-3293. DOI: 10.1007/s00268-018-4635-5.

[3] HWANG G Y, BAEK D W, CHO HJ, et al. Elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts survival in patients with advanced gastric cancer treated with trastuzumab combination chemotherapy[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(5): 3151-3156. DOI: 10.21873/anticancer.12578.

[4] WANG T, LU Z Y, TU X F, et al. Computerized tomography findings in calcified signet-ring gastric cancer receiving chemotherapy: a case report[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 474. DOI: 10.1186/s12885-018-4415-5.

[5] ZHANG J X, XU Y, GAO Y, et al. Decreased expression of miR-939 contributes to chemoresistance and metastasis of gastric cancer via dysregulation of SLC34A2 and Raf/MEK/ERK pathway[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 18. DOI: 10.1186/s12943-017-0586-y.

[6] WANG J, XUE X, HONG H, et al. Upregulation of microRNA-524-5p enhances the cisplatin sensitivity of gastric cancer cells by modulating proliferation and metastasis via targeting SOX9[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 574-582. DOI: 10.18632/oncotarget.13479.

[7] ZHANG H, CHENG Y, JIA C, et al. MicroRNA-29s could target AKT2 to inhibit gastric cancer cells invasion ability[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(1):342. DOI: 10.1007/s12032-014-0342-8.

[8] MATSUO M, NAKADA C, TSUKAMOTO Y, et al. MiR-29c is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 15. DOI: 10.1186/1476-4598-12-15.

[9] SAITO Y, SUZUKI H, IMAEDA H, et al. The tumor suppressor microRNA-29c is downregulated and restored by celecoxib in human gastric cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(8):1751-1760. DOI:

- 10.1002/ijc.27862.
- [10] SINGH ASETTLEMAN J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer[J]. *Oncogene*, 2010, 29(34): 4741-4751. DOI: 10.1038/onc.2010.215.
- [11] YAN L H, CHEN Z N, LI L, et al. miR-135a promotes gastric cancer progression and resistance to oxaliplatin[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(43):70699-70714. DOI: 10.18632/oncotarget.12208.
- [12] GE X, LIU X, LIN F, et al. MicroRNA-421 regulated by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis, inhibits apoptosis, and induces cisplatin resistance by targeting E-cadherin and caspase-3 in gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17): 24466-24482. DOI: 10.18632/oncotarget.8228.
- [13] SCOTT L J. Apatinib: a review in advanced gastric cancer and other advanced cancers[J]. *Drugs*, 2018, 78(7): 759. DOI: 10.1007 / s40265-018-0903-9.
- [14] ZHANG P F, SHENG L L, WANG G, et al. miR-363 promotes proliferation and chemo-resistance of human gastric cancer via targeting of FBW7 ubiquitin ligase expression[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 35284-35292. DOI: 10.18632/oncotarget.9169.
- [15] VIDAL A F, CRUZ A M, MAGALHAES L, et al. hsa-miR-29c and hsa-miR-135b differential expression as potential biomarker of gastric carcinogenesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(6): 2060-2070. DOI: 10.3748/wjg.v22.i6.2060.
- [16] DU P, ZHAO H, PENG R, et al. LncRNA-XIST interacts with miR-29c to modulate the chemoresistance of glioma cell to TMZ through DNA mismatch repair pathway[J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(5): BSR20170696. DOI: 10.1042/bsr20170696.
- [17] ARÉCHAGA-OCAMPO E, LOPEZ-CAMARILLO C, VILLEGAS-SEPULVEDA N, et al. Tumor suppressor miR-29c regulates radio-resistance in lung cancer cells[J/OL]. *Tumour Biol*, 2017, 39(3)[2018-04-20]. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1010428317695010>. DOI: 10.1177/1010428317695010.
- [18] ZHANG J X, QIAN D, WANG F W, et al. MicroRNA-29c enhances the sensitivities of human nasopharyngeal carcinoma to cisplatin-based chemotherapy and radiotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2013, 329(1): 91-98. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.10.033.
- [19] HUANG L, HU C, CAO H, et al. MicroRNA-29c increases the chemosensitivity of pancreatic cancer cells by inhibiting USP22 mediated autophagy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(2): 747-758. DOI: 10.1159/000490027.
- [20] SUN D M, TANG B F, LI Z X, et al. MiR-29c reduces the cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells by negatively regulating the PI3K / Akt pathway[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8007. DOI: 10.1038/s41598-018-26381-w.

[收稿日期] 2018-06-19

[修回日期] 2018-10-18

[本文编辑] 韩丹, 阮芳铭