



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R735.2

U D C 616-006

密级 公开

# 博士学位论文

microRNA-7 调控胃癌恶性生物学行为的  
功能与分子机制研究

赵晓迪

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 内科学(消化系病)

研 究 方 向 胃癌相关非编码 RNA

指 导 教 师 樊代明 教授(主任医师)

培 养 单 位 西京消化病医院

二〇一五年五月

# 独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：\_\_\_\_\_日期：\_\_\_\_\_

# 保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：\_\_\_\_\_导师签名：\_\_\_\_\_日期：\_\_\_\_\_

# 目 录

缩略语表 .....	1
中文摘要 .....	3
Abstract .....	7
前 言 .....	12
文献回顾 .....	13
正 文 .....	25
第一部分 miR-7 在胃癌细胞和胃癌组织中的表达模式及其临床意义 .....	25
1 材料 .....	25
1.1 细胞系 .....	25
1.2 组织标本 .....	25
1.3 主要试剂 .....	26
1.4 主要仪器 .....	26
2 方法 .....	27
2.1 细胞培养 .....	27
2.2 细胞和组织总 RNA 的提取 .....	27
2.3 实时定量 PCR 检测细胞和组织中 miR-7 的表达 .....	27
2.4 组织原位杂交检测组织芯片中 miR-7 的表达 .....	28
3 结果 .....	30
3.1 miR-7 在胃癌细胞和胃癌组织中的表达模式 .....	30
3.2 miR-7 表达与胃癌分级、分期的相关性 .....	31
4 讨论 .....	33
第二部分 miR-7 在胃癌细胞恶性生物学行为中的功能研究 .....	35
1 材料 .....	35
1.1 载体 .....	35
1.2 细胞系 .....	35

---

1.3 实验动物 .....	35
1.4 主要试剂 .....	35
1.5 主要仪器 .....	36
2 方法 .....	36
2.1 构建 miR-7 功能获得和功能缺失细胞模型 .....	36
2.2 过表达或沉默 miR-7 后的体外功能实验 .....	37
2.3 过表达或沉默 miR-7 后的体外功能实验 .....	39
3 结果 .....	40
3.1 构建 miR-7 功能获得和功能缺失细胞模型 .....	40
3.2 miR-7 抑制胃癌细胞体外增殖、促进凋亡和逆转耐药 .....	41
3.3 miR-7 抑制胃癌细胞迁移和侵袭 .....	43
3.4 miR-7 抑制胃癌细胞体内生长和转移 .....	44
4 讨论 .....	45
第三部分 miR-7 靶分子的高通量筛选与鉴定 .....	48
1 材料 .....	48
1.1 细胞系 .....	48
1.2 载体 .....	48
1.3 基因芯片 .....	48
1.4 主要试剂 .....	48
1.5 主要仪器 .....	49
2 方法 .....	49
2.1 瞬时转染构建 miR-7 过表达模型 .....	49
2.1 iTRAQ 技术高通量筛选 miR-7 过表达后的差异表达蛋白 .....	50
2.2 cDNA 基因芯片高通量筛选 miR-7 过表达后的差异表达基因 .....	50
2.4 iTRAQ 与基因芯片高通量筛选结果的数据分析 .....	51
2.5 双萤光素酶报告基因实验验证 miR-7 对靶分子的结合 .....	51
2.6 实时定量 PCR 检测细胞中 RELA、FOS 和 IGF1R 的表达 .....	53
2.7 Western blot 检测细胞中 RELA、FOS 和 IGF1R 的表达 .....	53
3 结果 .....	54

3.1 联合转录组学、蛋白质组学和生物信息学方法筛选 miR-7 的靶分子	54
3.2 RELA、FOS 和 IGF1R 是 miR-7 的直接靶分子	55
3.3 miR-7 负性调控 RELA、FOS 和 IGF1R 的表达	56
4 讨论	57
第四部分 miR-7 调控胃癌发生的机制研究	61
1 材料	61
1.1 载体	61
1.2 细胞系	61
1.3 组织芯片	61
1.4 实验动物	61
1.5 主要试剂	61
1.6 主要仪器	62
2 方法	62
2.1 过表达或沉默 RLEA 和 FOS 对胃癌细胞增殖能力的影响	62
2.2 萤光素酶报告基因系统检测 miR-7 对 IKK $\epsilon$ 的直接调控作用	63
2.3 ChIP 验证 RELA 与 miR-7 启动子区域的结合	63
2.4 miR-7 对胃癌细胞中 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响	64
2.5 幽门螺杆菌感染对 miR-7 生成的影响	64
2.6 IHC 检测胃癌组织芯片中 RELA 和 FOS 的表达	65
3 结果	65
3.1 miR-7 通过调控 RELA 和 FOS 抑制胃癌增殖	65
3.2 miR-7 与 NF- $\kappa$ B 构成双负反馈调控环路	68
3.3 miR-7 与 RELA 及 FOS 在胃癌组织中表达水平呈负相关	74
4 讨论	75
第五部分 miR-7 调控胃癌转移的机制研究	80
1 材料	80
1.1 载体	80
1.2 细胞系	80
1.2 实验动物	80

---

1.3 组织芯片 .....	80
1.4 主要试剂 .....	80
1.5 主要仪器 .....	81
2 方法 .....	81
2.1 过表达或沉默 IGF1R 对胃癌细胞迁移、侵袭和转移能力的影响 .....	81
2.2 实时定量 PCR 检测 E-cadherin 上游转录抑制因子的表达 .....	82
2.3 miR-7 对胃癌细胞 EMT 相关标志物表达的影响 .....	82
2.4 IHC 检测胃癌组织芯片中 IGF1R 的表达 .....	82
3 结果 .....	82
3.1 miR-7 通过调控 IGF1R 抑制胃癌细胞侵袭和转移 .....	82
3.2 miR-7 抑制胃癌细胞 EMT .....	86
3.3 miR-7 通过抑制 IGF1R/Snail 分子通路促进 E-cadherin 表达 .....	86
3.4 miR-7 与 IGF1R 在胃癌组织中表达水平呈负相关 .....	87
4 讨论 .....	89
小 结 .....	92
参考文献 .....	93
附 录 .....	102
个人简历和研究成果 .....	115
致 谢 .....	117

## 缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
5-FU	5-fluorouracil	5-氟尿嘧啶
AJCC	American Joint Committee on Cancer	美国癌症联合委员会
ARE	AU rich element	富含腺嘌呤/尿嘧啶元件
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CDDP	Cisplatin	顺铂
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation	染色质免疫共沉淀
DAB	diaminobenzidine	二氨基联苯胺
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EMT	Epithelial-mesenchymal Transition	上皮-间质转化
GFP	Green Fluorescent Protein	绿色荧光蛋白
Hr	Hour	时
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IgG	immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IHC	immunohistochemistry	免疫组织化学染色
IRS	Immunoreactivity score	免疫反应评分
ISH	<i>in situ</i> hybridization	免疫原位杂交

Kb	kilobase pair	千碱基对
KD	kilodalton	道尔顿
LPS	Lipopolysaccharide;	脂多糖
LV	Lentiviral Vector	慢病毒载体
Min	Minute	分
miRISC	miRNA-induced silencing complexes	miRNA 诱导沉默复合体
miRNA	microRNA	微小 RNA
MOI	Multiplicity of infection	复感染指数
NC	negative control	阴性对照
OncomiR	Oncogenic miRNA	促癌 miRNA
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
pre-miRNA	Precursor miRNA	次级 miRNA
pri-miRNA	Primary miRNA	初级 miRNA
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
Sec	Second	秒
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
TSmiR	Tumor Suppressor miRNA	抑癌 miRNA
UTR	Untranslated Region	非编码区



# microRNA-7 调控胃癌恶性生物学行为的 功能与分子机制研究

博士研究生：赵晓迪

导 师：樊代明 教授

辅 导 教 师：聂勇战 教授

时永全 教授

第四军医大学西京消化病医院，西安 710032

资助基金项目：国家重点基础研究发展计划（2010CB529300）

## 中文摘要

### 【背景】

胃癌是我国乃至世界范围内发病率和病死率均位居前列的恶性肿瘤。胃癌的发生是多种恶性生物学表型相互交织、相互影响、相互促进的序贯过程，其本质是细胞中分子事件从稳态走向紊乱的总和。因此，研究胃癌发生过程中的关键分子事件，阐明其中的分子调控机制，将为胃癌临床治疗提供新的思路和方法。

微小 RNA（microRNA，miRNA）是近年发现的一类在真核细胞中发挥重要调控作用的内源性非编码 RNA。miRNA 通过与蛋白编码基因 mRNA 结合，在转录后水平抑制基因表达，从而调控机体的生长发育和疾病发生过程。miRNA 的调控特点在于其“一对多”的作用模式，即单个 miRNA 可通过碱基不完全互补配对方式抑制多个基因表达。此种调控方式可引起细胞内大量分子相互作用关系和信号传导通路改变，因此，miRNA 被认为是调控细胞生物学行为的关键分子之一。

microRNA-7（miR-7）于 2001 年首次在果蝇中被发现。2008 年以来，miR-7 在

肿瘤中的作用被陆续报道，称其在肝癌、肺癌和乳腺癌中表达降低，发挥抑癌基因的作用；近年来，亦有报道指出 miR-7 可促进肾癌的发生。可见，miR-7 在肿瘤中的功能与机制仍不明确。本实验室前期通过比对高、低转移胃癌细胞系的 miRNA 表达谱，发现 miR-7 在高转移细胞系中表达量显著降低，提示其可能在胃癌发生和发展过程中发挥抑癌基因的作用。基于文献报道和前期研究结果，本研究将进一步聚焦 miR-7，为阐明其在胃癌恶性生物学行为中发挥的关键功能和调控机制提供理论和实验依据。

### 【目的】

1. 明确 miR-7 与胃癌发生发展的相关性。
2. 明确 miR-7 在调控胃癌恶性生物学行为中所发挥的功能。
3. 揭示 miR-7 在胃癌中发挥功能的分子生物学机制。
4. 揭示 miR-7 在胃癌中表达失调的原因。

### 【方法】

1. 利用实时定量 PCR 方法检测胃上皮细胞和胃癌细胞、胃癌新鲜组织标本及其匹配的癌旁正常组织中 miR-7 的表达差异；利用原位杂交 (ISH) 技术检测胃癌组织芯片中 miR-7 的表达水平，并统计分析其与胃癌病理参数间的相关性。

2. 合成 miR-7 的模拟物和抑制物，并构建 miR-7 的过表达和 shRNA 干扰载体，分别通过瞬时转染和稳定感染，建立 miR-7 的功能获得与功能缺失细胞模型；分别通过细胞生长曲线、平板集落形成实验、软琼脂集落形成实验、流式细胞术、Transwell 迁移和侵袭实验、裸鼠移植瘤实验和裸鼠转移瘤实验等方法，研究上、下调 miR-7 对胃癌细胞增殖、凋亡和转移等恶性生物学行为的影响。

3. 联合运用 cDNA 基因芯片技术和蛋白组学 iTRAQ 技术，分别在胃癌细胞的转录组和蛋白质组两个层次，高通量筛选过表达 miR-7 后的差异表达基因，并结合生物信息学方法，筛选差异表达基因中的 miR-7 直接作用靶分子；采用双萤光素酶报告基因系统，验证 miR-7 与候选靶分子间的相互作用关系；在胃癌细胞中上调或下调 miR-7 后，利用蛋白印迹 (Western blot) 和实时定量 PCR 方法分别检测候选靶分子的表达变化；通过功能实验和功能挽救实验，分别验证 miR-7 的靶分子在胃癌恶性生物学行为中所发挥的功能以及 miR-7 通过调控这一靶分子对胃癌恶性生物学行为的影响。

4. 通过生物信息学方法, 预测 miR-7 启动子区域的转录因子结合位点; 通过上调或下调这一转录因子, 采用实时定量 PCR 方法检测 miR-7 初始转录本 (primary miR-7, pri-miR-7) 的表达变化; 利用染色质免疫共沉淀 (ChIP) 实验, 在胃癌细胞中验证此转录因子与 miR-7 启动子的结合情况; 在胃癌细胞中上调或下调 miR-7, 分别利用免疫荧光和实时定量 PCR 方法, 检测 miR-7 对此转录因子表达和定位, 以及其下游效应分子表达的影响。

### 【结果】

1. 实时定量 PCR 结果表明, 与正常胃上皮细胞相比, miR-7 在胃癌细胞中表达降低, 且在高转移胃癌细胞中表达进一步降低; 与癌旁正常组织相比, miR-7 在胃癌组织中的表达降低, 且在胃癌转移灶中的表达较原发灶进一步降低; 组织芯片 ISH 结果表明, miR-7 在大多数胃癌临床标本中呈低表达, 其表达水平与胃癌分级和分期呈负相关, 与胃癌患者生存期呈正相关, 并可作为判断胃癌预后的独立危险因素。

2. 实时定量 PCR 结果表明, 通过转染和感染 miR-7 的模拟物和抑制物, 以及 miR-7 的过表达载体和 shRNA 干扰载体, 能够有效上、下调 miR-7 在胃癌细胞中的表达水平; 细胞生长曲线、平板集落形成实验和软琼脂集落形成实验表明, miR-7 能够抑制胃癌细胞的体外生长过程; 通过流式细胞术检测细胞周期, 结果表明 miR-7 能够抑制胃癌细胞周期进展; 通过流式细胞技术检测细胞凋亡, 结果表明 miR-7 能够促进胃癌细胞早期凋亡; Transwell 迁移与侵袭实验结果表明, miR-7 能够抑制胃癌细胞的迁移和侵袭能力; 裸鼠移植瘤实验结果表明, miR-7 能够抑制胃癌细胞的体内生长过程; 裸鼠转移瘤实验结果表明, miR-7 能够抑制胃癌细胞形成转移灶的能力。

3. 在胃癌细胞中瞬时转染 miR-7 后, 联合运用 cDNA 基因芯片、iTRAQ 技术和生物信息学方法, 在全基因组的 mRNA 和蛋白水平高通量筛选出下调的差异表达基因分别为 180 个和 75 个, 其中重点关注 miR-7 对 RELA、FOS 和 IGF1R 等与肿瘤增殖和转移表型密切相关基因的调控; 双萤光素酶报告基因实验结果表明, miR-7 能够直接结合 RELA、FOS 和 IGF1R 的 3'末端非编码区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 上的结合位点; 实时定量 PCR 和 Western blot 结果表明, miR-7 与 RELA 和 FOS 的 mRNA 和蛋白表达均呈负相关, 但其与 IGF1R 的负相关关系仅存在于蛋白水平; 通过上调或下调 RELA 和 FOS 的功能实验结果表明, RELA 和 FOS 能够促进胃癌细胞增殖, 抑制胃癌细胞凋亡; 功能挽救实验结果表明, miR-7 能够通过调控 RELA 和

FOS 抑制胃癌增殖；进一步机制研究表明，miR-7 可通过负向调控 IKK $\epsilon$  抑制 RELA 的激活；通过上调或下调 IGF1R 的功能实验结果表明，IGF1R 能够促进胃癌细胞侵袭和转移；功能挽救实验结果表明，miR-7 能够通过调控 IGF1R 抑制胃癌侵袭和转移；进一步机制研究表明，miR-7 可通过抑制 IGF1R，降低 Snail 的表达，间接促进 E-cadherin 的表达，抑制胃癌细胞的上皮-间质转化（EMT）过程。

4. 实时定量 PCR 结果表明，在胃上皮细胞中过表达 IKK $\epsilon$  和 RELA 可抑制 pri-miR-7 的表达，在胃癌细胞系中干扰 IKK $\epsilon$  和 RELA 可促进 pri-miR-7 的表达；通过生物信息学方法，预测到人类基因组中 miR-7 的 3 个编码基因的启动子区域共存在 7 簇 NF- $\kappa$ B 的结合位点；ChIP 实验结果表明，RELA 能够与 miR-7-1 和-2 基因的启动子区域相结合；免疫荧光结果表明，过表达 miR-7 可抑制 IKK $\epsilon$  和 RELA 的表达，并能够抑制 RELA 的核转位；实时定量 PCR 结果表明，过表达 miR-7 可抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路下游多个效应分子的表达；启动子报告基因和实时定量 PCR 结果表明，幽门螺杆菌感染能够上调 NF- $\kappa$ B 转录活性，并抑制 pri-miR-7 的表达。

#### 【结论】

本研究明确了 miR-7 在胃癌细胞和组织中的表达模式，揭示了 miR-7 表达降低与胃癌的发生发展相关性；明确了 miR-7 在调控胃癌恶性生物学行为中所发挥的功能，表明其在胃癌中起到抑制细胞增殖、促进凋亡和抑制转移的作用；揭示了 miR-7/IKK $\epsilon$ /RELA 和 miR-7/IGF1R/Snail 两条分子通路分别影响胃癌增殖和转移表型的分子机制；揭示幽门螺杆菌感染导致 NF- $\kappa$ B 分子通路过度激活对 miR-7 在胃癌中表达降低的重要影响。本研究为认识 miR-7 在胃癌恶性生物学表型中发挥的关键功能与调控机制提供了理论基础，并使得 miR-7 有望成为胃癌临床治疗行之有效且机制明确的新靶点。

**关键词：**胃癌；miR-7；增殖；转移

# Functional Elucidation & Mechanistic Study of microRNA-7 in Gastric Carcinogenesis

Candidate for PhD: *Zhao Xiaodi*

Supervisor: **Prof. Fan Daiming**

Tutor: **Prof. Nie Yongzhan**

**Prof. Shi Yongquan**

Xijing Hospital of Digestive Diseases, Fourth Military Medical University,

Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: National Key and Basic Research Development Program of China

(973 Program, NO. 2010CB529300)

## Abstract

### *Background*

Gastric cancer remains the most malignant tumor throughout China and the world, with high morbidity and mortality. The development and progression of gastric cancer is a sequential process intertwined with multiple malignant phenotypes that mutually influence each other. Under the influence of all of these molecular events, epithelial cells are in a disturbed equilibrium state and undergo disorder and chaos. Thus, elucidation of the crucial molecular events during gastric carcinogenesis and clarification of the underlying molecular mechanisms will provide new strategies for gastric cancer treatment.

MicroRNAs (miRNA) are a group of recently identified endogenous non-coding RNAs that play an important regulatory role in eukaryotic cells. miRNA functions in RNA silencing and the post-transcriptional regulation of gene expression by binding to the 3'-untranslated regions (UTRs) of target mRNAs, thus regulating the normal physiological functions and human disease. miRNA functions in a “one to multiple” mode, which means

that one miRNA may regulate a set of genes as its targets. Such regulatory modes could cause alterations among multiple protein-protein interactions and among the entire pathways. Thus, miRNAs are well known for their critical roles in regulating cell biological behaviors.

microRNA-7 (miR-7) was first discovered in 2001 in *Drosophila*. Since 2008, the function of miR-7 in tumors has been reported. Some reports indicate that miR-7 is downregulated in liver, lung and breast cancers and functions as a tumor suppressor, whereas others suggest that miR-7 promotes carcinogenesis. However, the function of miR-7 in tumors and its underlying mechanisms remain elusive. Our previous work identified miR-7 as one of the most downregulated miRNAs in highly metastatic gastric cancer cells based on miRNA microarray analysis, suggesting that miR-7 plays a tumor suppressive role in gastric cancer carcinogenesis and progression. Based on previous reports and our preliminary data, the current study aims to determine the role of miR-7 in gastric cancer, elucidate its key functions and regulatory mechanisms, and thus provide novel understanding of the mechanism by which miRNA functions in gastric cancer.

### ***Objectives***

1. To determine the correlation of miR-7 levels with the clinic pathological parameters of gastric cancer;
2. To determine the roles of miR-7 in regulating the malignant biological characteristics of gastric cancers;
3. To elucidate the underlying mechanisms that mediate miR-7 function;
4. To explore the causes of miR-7 downregulation in gastric cancer.

### ***Methods***

1. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to determine miR-7 expression in a normal gastric epithelial cell line and adenocarcinoma cell lines. Samples from fresh gastric cancer tissues and matched adjacent normal tissues were also collected and used for real-time PCR detection of miR-7 expression. *In situ* hybridization (ISH) was utilized to detect miR-7 expression levels in gastric cancer tissue arrays, and statistical analyses were performed to compare the correlation between miR-7 expression and

clinicopathological parameters.

2. miR-7 mimics and inhibitors were synthesized, and miR-7 overexpression and shRNA lentiviral vectors were also constructed. miR-7 gain- and loss-of-function models were established via transient transfection and stable infection. The role of miR-7 in gastric cancer cell proliferation, apoptosis and metastasis was studied using the MTT assay, colony formation assay, soft agar colony assay, flow cytometry, Transwell migration and invasion assay, and nude mice xenograft assay and tail vein metastatic assay.

3. Via the combinational use of proteomic iTRAQ technology and cDNA microarrays, the direct targets of miR-7 were screened using high throughput methods at the transcriptional and post-transcriptional levels. Bioinformatic analysis was performed to select the molecules that were differentially expressed. A dual-luciferase reporter gene system was used to verify the relationship between miR-7 and its potential target genes. Western blot and real-time PCR were also performed to validate the expression changes of target genes after up- or down-regulation of miR-7. Functional studies and rescue assays were also performed to evaluate the effect of miR-7 on gastric malignant phenotypes mediated by those target molecules.

4. Bioinformatic analyses were performed to predict the upstream transcription factor binding site in the miR-7 promoter region. Real-time PCR was used to detect the change in expression of the miR-7 initial transcript (primary miR-7, pri-miR-7) upon modulation of those transcription factors. Using chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays, the binding of candidate transcription factors to the miR-7 promoter region was further confirmed. Immunofluorescence and Western blot were used to detect the expression level and the sub-cellular localization of those transcription factors after up- or down-regulation of miR-7 expression. The changes in downstream effector molecules were also detected.

### ***Results***

1. Real-time PCR results demonstrated that miR-7 expression was significantly decreased in gastric cancer cells and further reduced in gastric cancer cell lines with high metastatic potential compared with normal gastric epithelial cells. Compared with adjacent normal tissues, miR-7 expression was greatly reduced in the gastric cancer tissues and

further reduced in the metastatic sites compared with the primary tumor. ISH in tissue arrays revealed that miR-7 is lowly expressed in most gastric cancer specimens and is negatively correlated with clinical stage. Furthermore, its expression is positively correlated with the patient survival time and could serve as an independent risk factor for the prognosis of gastric cancer.

2. miR-7 expression was successfully modulated either by transient transfection of miR-7 mimics and inhibitors or stable miR-7 lentiviral infection. MTT, colony formation and soft agar colony formation assays revealed that miR-7 inhibits the *in vitro* growth and proliferation of gastric cancer cells. Cell cycle analysis by flow cytometry revealed that miR-7 inhibits cell cycle progression in gastric cancer cells. Cell apoptosis detection by flow cytometry also revealed that miR-7 promotes early apoptosis in gastric cancer cells. Transwell migration and invasion assays indicated that miR-7 inhibits the migration and invasion of gastric cancer cells. Nude mice xenograft assays revealed that miR-7 can inhibit the *in vivo* growth of gastric cancer cells. Tail vein metastatic assays demonstrated that miR-7 has the capacity to inhibit gastric cancer cells from forming metastatic sites in the liver, lung and other organs.

3. BGC823 cells were transiently transfected with miR-7 mimics. Then, iTRAQ technology, cDNA microarray and bioinformatic analyses were performed in combination to identify 39 molecules that were significantly downregulated in the genome-wide high-throughput screen. Among them, 16 molecules contain potential miR-7 binding sites. Our study mainly focused on miR-7-mediated regulation of RELA, FOS and IGF1R. Dual luciferase reporter gene assay results indicate that miR-7 directly binds the 3' untranslated region (UTR) of RELA, FOS and IGF1R. qPCR and Western blot analysis revealed that miR-7 expression is negatively correlated with both mRNA and protein expression of RELA and FOS. In contrast, miR-7 expression is negatively correlated with IGF1R expression at the protein level. By modulating RELA and FOS expression in the subsequent functional study, we demonstrated that RELA and FOS promote gastric cancer cell proliferation and contribute to resistance to apoptosis. Rescue experiments indicated that miR-7 inhibits cancer cell proliferation through the suppression of RELA and FOS.



Further studies also revealed that miR-7 inhibited IKK $\epsilon$  to reduce the activation of RELA. However, IGF1R promotes gastric cancer cell invasion and metastasis according to gain and loss of function studies. Rescue studies indicated that miR-7 inhibits gastric cancer cell invasion and metastasis by targeting IGF1R expression. Further mechanical studies indicate that miR-7 inhibits IGF1R, reduces Snail expression and promote E-cadherin expression, which ultimately suppress the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process in gastric cancer cells.

4. Through bioinformatic analyses, 7 clusters of NF- $\kappa$ B binding site were identified in the upstream promoter region of human miR-7. Real-time PCR results indicated that o IKK $\epsilon$  and RELA overexpression in normal gastric epithelial cells inhibits pri-miR-7 expression, whereas IKK $\epsilon$  and RELA downregulation in gastric cancer cells enhances pri-miR-7 expression. ChIP assays also indicated that RELA could bind to the promoter region of both miR-7-1 and miR-7-2 genes. Immunofluorescence revealed that miR-7 potentially suppresses the expression of IKK $\epsilon$  and RELA and inhibits nuclear translocation. Real-time PCR results revealed that miR-7 inhibits multiple effectors downstream of the NF- $\kappa$ B signaling pathway.

### ***Conclusions***

The current study defined miR-7 expression levels in gastric cancer cells and tissues and revealed that decreased miR-7 expression is closely related to the development of gastric cancer. The effects of miR-7 in gastric malignant behaviors were also characterized. miR-7 exerts inhibitory effects on cancer cell proliferation, apoptotic resistance and metastasis via regulation of the IKK $\epsilon$ /RELA and IGF1R/Snail/E-cadherin axes. Furthermore, we also identified the important role of the NF- $\kappa$ B pathway, which is responsible for the aberrant expression of miR-7 in gastric cancer. The current study elucidates a crucial role of miR-7 in gastric carcinogenesis and progression and provides a potentially potent target for gastric cancer targeted therapy.

**Key words:** Gastric cancer; miR-7; proliferation; metastasis

# 前 言

胃癌的发生和发展是多种恶性生物学表型相互交织、相互影响、相互促进的序贯过程，其本质是细胞中分子事件从稳态走向紊乱的总和。因此，研究胃癌发生和发展过程中的关键分子事件，阐明其中的分子调控机制，将为胃癌临床治疗提供新的思路和方法。miRNA 是近年发现的一类在真核细胞中发挥重要调控作用的内源性非编码 RNA。miRNA 通过与蛋白编码基因 mRNA 结合，在转录后水平抑制基因表达，进而调控机体的生长发育和疾病发生过程。研究表明，单个 miRNA 可通过碱基不完全互补配对方式抑制多个基因表达，此种“一对多”的调控方式可引起细胞内大量分子相互作用关系和信号传导通路变化。因此，miRNA 被认为是调控细胞生物学行为的关键分子之一。

近年来，miR-7 在肿瘤中的作用被陆续报道。其中多数研究表明，miR-7 在肝癌、肺癌和乳腺癌等肿瘤中表达普遍降低，发挥着抑癌基因的作用；但亦有报道指出，miR-7 可在某些肿瘤中表达升高，且与预后不良呈正相关，提升其也扮演了促癌基因的角色。可见，miR-7 在肿瘤中功能的认识仍不明确，有待进一步深入探讨。本实验室前期通过比对高、低转移胃癌细胞系 GC9811 和 GC9811-P 的 miRNA 表达谱，发现 miR-7 在高转移细胞系 GC9811-P 中表达量显著降低，提示其可能在胃癌发生和发展过程中发挥抑癌基因的作用。基于前期文献报道和本实验室研究结果，本研究将聚焦 miR-7，为阐明其在胃癌恶性表型中发挥的关键功能和调控机制提供理论和实验依据。

# 文献回顾

## 1 miRNA 概述：从基因组学到机制研究

microRNA (miRNA) 是多细胞生物中广泛存在的一类平均长度为 22 个核苷酸 (nucleotide, nt) 的内源性小分子 RNA。miRNA 通过靶向蛋白编码基因的 mRNA (messenger RNA, mRNA), 促进其降解或抑制其翻译, 在转录后水平调控基因表达, 在基因组信息转化为分子效应和生物效应过程中发挥着重要的调控作用。miRNA 的发现相对较晚, 但随着近年来对其研究的逐步深入, 目前对 miRNA 的认识已取得重大进展。本节将对 miRNA 的基因组学、生成过程和作用机制等方面的研究进展作一概述。

### 1.1 miRNA 的基因组学

1993 年, Lee 等报道在秀丽新小杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 内调控时序性发育的 *lin-4* 基因的编码产物并非蛋白, 而是两条不同长度的 RNA (其中较长 RNA 是较短者的前体), 并发现 *lin-4* 的 RNA 产物的序列能与另一基因 *lin-14* 的 3'-UTR 区中多个位点的序列互补<sup>[1]</sup>。同年, Wightman 进一步发现 *lin-4* 可抑制 *lin-14* 基因的蛋白表达, 但不影响 *lin-14* 的 mRNA 表达, 提示 *lin-4* 对 *lin-14* 的调控处在转录后水平<sup>[2]</sup>。但在此后 7 年内, 并没有类似的 RNA 被报道。直到 2000 年, Pasquinelli 等在线虫 (*Nematodes*) 中鉴定到另一个与 *lin-4* 类似大小并具有调控作用的 RNA——*let-7*<sup>[3]</sup>。随后, *let-7* 基因及其同源基因相继在人类、果蝇 (*Drosophila*) 和其他对称动物 (bilateral animal) 中被发现。迄今为止, 更多的 miRNA 基因相继在动植物和微生物中被发现, 并且数量不断增加。2014 年 6 月, 国际权威 miRNA 公共数据库 miRBase 已更新至 21.0 版本, 其中收录了 223 个物种的 28645 条 miRNA 前体和 35828 条 miRNA 成熟体<sup>[4]</sup>。

#### 1.1.1 miRNA 基因的定位

根据 miRNA 与基因组中已知蛋白编码基因的定位关系, 可分为基因间 miRNA 和内含子 miRNA。在多数物种的基因组中, 大部分 miRNA 基因的分布与线虫中 *lin-4*

和 *let-7* 基因类似，均位于蛋白编码基因的间隔部位，称为基因间 miRNA (intergenic miRNA)，此类 miRNA 一般具有自身独立的转录调控元件<sup>[5]</sup>。多个基因间 miRNA 在染色体上彼此紧密相邻，构成一些成簇分布的基因群，称为 miRNA 基因簇 (miRNA cluster)。miRNA 基因簇在共同的启动子调控下，表达生成含多顺反子 (multi-cistron) 的初始转录本<sup>[6]</sup>。研究发现，在果蝇基因组中，有超过半数的 miRNA 基因是成簇排列的<sup>[7]</sup>，而人类基因组中仅存在少量 miRNA 基因成簇排列<sup>[8]</sup>，但这种观念很可能随着人类基因组中 miRNA 基因簇的不断发现而改变。成簇排列的 miRNA 基因间既可以具有同源性关系，也可不具有任何同源性，但一般具有功能上的相关性<sup>[5]</sup>，提示 miRNA 基因簇可能具有复杂的调控机制和研究价值。另一类 miRNA 基因位于已知蛋白编码基因的内含子中，称为内含子 miRNA (intronic miRNA)，编码内含子的基因，则称为“宿主基因”。内含子 miRNA 基因的数量约占人类 miRNA 基因总数的四分之一<sup>[5]</sup>。多数内含子 miRNA 的转录与宿主基因方向一致，提示其与宿主基因共表达。由于这些 miRNA 编码基因位置的特殊性，有研究表明二者能够协调发挥某种生物学功能<sup>[5, 7]</sup>。此外，少部分内含子 miRNA 基因与其宿主基因方向相反<sup>[5]</sup>，提示这些 miRNA 不与宿主基因共表达，其与宿主基因功能的关系仍有待深入研究。

### 1.1.2 miRNA 基因的表达特征

研究表明，生物体内 miRNA 基因的表达模式具有时间特异性和空间特异性。miRNA 表达的时间特异性体现在生物体的发育过程中。最为著名的例证是线虫的 *let-7* 基因，它的表达依赖于线虫的生长发育周期；在动物体内，*let-7* 在发育早期呈低表达，而在分化成熟的组织呈高表达<sup>[9]</sup>。这种 miRNA 表达的时间特异性集中体现在中枢神经系统的发育过程中，其变化频率更为短暂，形式更为丰富。Krichevsky 等利用寡核苷酸微阵列检测了小鼠大脑组织中 44 个 miRNA 的表达，发现其中 20% 的 miRNA 的表达水平伴随着大脑发育发生了显著变化<sup>[10]</sup>。Miska 等首次利用 miRNA 芯片检测小鼠大脑组织中 138 个 miRNA 的表达，发现其中一类 miRNA 表达水平随时间呈现波浪式变化<sup>[11]</sup>。miRNA 表达的空间特异性体现在生物体的分化过程中。研究表明，在不同的器官、组织和细胞类型中，miRNA 的表达谱有很大差异。Babak 等利用 miRNA 芯片分析了小鼠 17 种的不同器官和组织，发现在所检测的 78 个 miRNA 中，有一半以上的 miRNA 存在组织特异性分布的特征<sup>[12]</sup>。Liang 等通过检测正常人体 40 份不同组织中 345 个 miRNA 的表达，通过聚类分析得到了 8 组具有组

织特异性的 miRNA 表达模式<sup>[13]</sup>。由于 miRNA 表达的时空特异性，其所调控的靶分子谱也会随着细胞类型的不同或者细胞的发育分化阶段的不同而改变。以上研究结果不仅说明了 miRNA 及其靶分子具有时空动态变化的特性，也进一步提示 miRNA 作用机制的复杂性。

## 1.2 miRNA 的产生过程

与蛋白编码基因类似，miRNA 基因编码的直接转录产物并不具备生物学功能。miRNA 生物学效应的发挥需经历一系列的转录后加工程序。简而言之，动物细胞内的 miRNA 基因由 RNA 聚合酶转录后，首先生成 miRNA 初始转录本，也称初级 miRNA (primary miRNA, pri-RNA)；随后，pri-miRNA 还需要经历两次剪切，分别生成 miRNA 前体，也称次级 miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA) 和成熟的 miRNA，直至其发挥作用。

### 1.2.1 miRNA 的转录

RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, pol II) 和 RNA 聚合酶 III (RNA polymerase III, pol III) 均能够参与 miRNA 的转录。一般认为，差别在于 pol II 通常能够转录较长的 RNA 片段，包括 mRNA 和部分非编码 RNA，而 pol III 通常只具备转录较短的非编码 RNA 片段的能力<sup>[5]</sup>。较早的观点认为，基因间 miRNA 通常具备独立的启动子自行完成转录，而内含子 miRNA 通常与其宿主基因具有转录一致性。然而，最近有研究表明，内含子 miRNA 也存在独立的转录机制。Fujita 等在研究 miR-21 时发现，pri-miR-21 在 293T 细胞中的转录本长约 3.5 kb，而在佛波酯处理的 HL-60 细胞中，其转录本长达 4.5 kb，推测其使用了独立启动子<sup>[14]</sup>。此外，Ozsolak 等推测约占三分之一的内含子 miRNA 可能具备独立的启动子，而这些启动子通常远离其宿主基因的转录起始位点<sup>[15]</sup>。

在 pol II 的介导下，内含子 miRNA 基因可转录生成长度超过 1 千碱基对 (kilobase, kb) 的 pri-miRNA，其通常具有与 mRNA 类似的 5' 端的帽子结构和 3' 端的多聚腺苷酸 (polyA) 尾，并能够形成多个茎-环样 (stem-loop-like) 或发卡样 (hairpin-like) 的 RNA 二级结构<sup>[5]</sup>。Gruber 等研究发现，与 mRNA 帽子结构复合物相互作用的 Ars2 蛋白同样能够影响某些 pri-miRNA 的加工过程，其中包括 miR-21、let-7 和 miR-155 等<sup>[16]</sup>。目前对基因间 miRNA 基因转录的认识有限，有研究表明部

分基因间 miRNA 基因也可转录生成 pri-miRNA, 并具有类似结构<sup>[17]</sup>。Mahony 等通过分析 145 个基因间 miRNA 的 5'-UTR 发现, 这些序列较蛋白编码基因的 5'-UTR 更具保守性, 推测可能含有增强子或沉默子的作用位点<sup>[18]</sup>。

### 1.2.2 miRNA 的成熟

在动物细胞内, miRNA 的成熟过程通常需经历以下步骤: 首先, pri-miRNA 被加工成 pre-miRNA。pri-miRNA 在细胞核内的加工主要由 III 型 RNA 核酸内切酶 Drosha 和含双链 RNA 结合结构域的 DGCR8 组成的微处理器复合体(microprocessor)完成。DGCR8 能够特异性识别双链中茎-环结构与单链间的链接部位, 并指导 Drosha 切割 pri-miRNA 生成约长度 70 nt 的不含单链的茎-环结构, 即 pre-miRNA。Han 等发现 Drosha 和 DGCR8 存在转录后水平的交互反馈调控: DGCR8 通过蛋白间相互作用稳定 Drosha 的蛋白, 而 Drosha 可稳定 DGCR8 的 mRNA<sup>[19]</sup>。此外, DEAD 盒蛋白家族的 ATP 依赖性 RNA 解旋酶 p68、p72, 核糖核蛋白复合物以及核因子等也在该复合体中发挥着重要的功能。内源性的 p68 和 p72 能促进 Drosha 对 pri-miRNA 的加工。Fukuda 等在小鼠胚胎中发现, p72 和 p68 缺失可导致成熟 miRNA 的水平降低<sup>[20]</sup>。Drosha 和 p68 还可通过与细胞内某些蛋白相互作用, 以调控 pri-miRNA 生成加工过程。Suzuki 等发现在 DNA 受损的条件下, 野生型 p53 能够协同 p68 促进 Drosha 对某些 pri-miRNA 的加工, 如 pri-miR-16-1、pri-miR-143 和 pri-miR-145; 突变型 p53 不能招募 Drosha, 反而会阻止微处理器复合体的形成<sup>[21]</sup>。此外, 有研究指出, 某些 miRNA 的生成加工过程并不依赖 Drosha, 如: 内含子 miRNA 中的一个称为 mirtron 的亚型, 其通常具有潜在的发卡结构, 能够直接形成 pre-miRNA 发卡结构而不依赖于微处理器复合体<sup>[22]</sup>; 某些内源性的小核仁 RNA (small nucleolar RNA, snoRNA) 也能够直接生成包含两个类似 pre-miRNA 发卡结构的转录物, 其中一个发卡结构可生成 miRNA<sup>[23]</sup>; 另外, 某些病毒 miRNA 前体也是不经 Drosha 途径产生 pre-miRNA 的直接来源。

其次, pre-miRNA 生成后, 核孔复合体中的 Exportin-5 通过 Ran-GTP 依赖机制将 pre-miRNA 从细胞核转运至细胞浆<sup>[5]</sup>。在细胞核内, Ran-GTP 浓度较高, Exportin-5 与 Ran-GTP 相结合, 识别 pre-miRNA 的双链和 3'端, 促使其从 Drosha 中解离, 并通过核孔复合体。Exportin-5 携带 pre-miRNA 进入细胞浆后, Ran-GTP 被水解为 Ran-GDP, 从而释放出 pre-miRNA。目前对 pre-miRNA 出核的机制认识有限, 但有



证据显示这一过程受到严密调控。pre-miR-31 在胰腺癌细胞系 HS766T 中能够正常转运出核，而其却在乳腺癌细胞系 MCF7 的细胞核聚积，提示其出核的过程在不同细胞类型中受到的调控方式也不尽相同<sup>[24]</sup>。

再次，pre-miRNA 在细胞浆中需进一步被加工成为成熟的 miRNA。在细胞浆中，另一个 III 型 RNA 核酸内切酶 Dicer 负责 pre-miRNA 的第二次加工。Dicer 具有多个结构域，包括两个纵列的 III 型 RNA 酶结构域、一个 ATP 结合结构域和一个双链 RNA 结合结构域。Dicer 可以识别 Drosha 切割产物的末端序列，并定位第二次切割位点，将具有茎-环结构的稳定 pre-miRNA 切割成一个不稳定的长度约 22 nt 的双链 miRNA，即 miRNA/miRNA\* 结构。这种双链 miRNA 结构可选择性地与 Ago 蛋白（Argonaute）家族成员之一结合，并与 TAR RNA 结合蛋白和 PKR 蛋白激活因子等共同组成 miRNA 诱导的沉默复合体（miRNA-induced silencing complexes, miRISC）<sup>[5]</sup>。通常，在 miRNA/miRNA\* 所形成的双链中，其中 5' 末端碱基配对稳定性较低的一条链被保留，成为成熟体 miRNA；另一条链则被迅速降解；但近年研究显示，一些 miRNA\* 可在细胞内稳定存在，并具有相应的调控功能<sup>[25]</sup>。另外，pre-miRNA 加工还存在不依赖 Dicer 的其他途径。研究表明，pre-miR-451 可在核内折叠形成较为特殊的二级结构，这一结构能被 Ago2 直接识别并切割加工成为成熟的 miRNA<sup>[26, 27]</sup>。

### 1.3 miRNA 发挥功能的分子机制

miRNA 调控功能的发挥主要是通过其 5' 端被称为种子序列（seed sequence）的长度约 7 nt 的序列与位于 mRNA 的 3' 端非编码区（3'-UTR）的 miRNA 调控元件（miRNA Regulatory Element, MRE）互补配对，以识别靶分子。miRNA 与靶分子 MRE 间的互补配对程度可决定 miRISC 抑制靶分子 mRNA 的作用机制：与 MRE 配对程度较高的 miRNA（如大部分植物中的 miRNA）将通过类似于小干扰 RNA（small interference RNA, siRNA）的作用机制，导致靶分子 mRNA 的切割和降解；在动物细胞中，大部分 miRNA 与靶分子 mRNA 并不能完全配对，可能通过翻译抑制发挥作用。

#### 1.3.1 miRNA 的作用机制

一般认为，miRNA 对靶分子的负性调控主要在基因转录后的翻译过程。现阶段研究表明，miRNA 可能通过以下 3 种机制抑制翻译的起始过程：（1）miRNA 通过抑

制核糖体的组装以阻断翻译起始。Pillai 等发现被 miRISC 沉默的 mRNA 缺乏偶联完整的核糖体，由此推测 miRNA 可能影响了靶分子 mRNA 核糖体的装配过程<sup>[28]</sup>。(2) miRISC 通过抑制翻译起始复合物的形成以阻断翻译起始。Mathonnet 等在体外系统中发现，增加一种含 mRNA 的 m<sup>7</sup>G 帽子结合蛋白和翻译起始因子 eIF4E 的复合物 eIF4F 的水平，可部分恢复 miRNA 引起的翻译抑制<sup>[29]</sup>。Kiriakidou 等发现 Ago2 蛋白的中间结构域类似于 eIF4E，具有结合 m<sup>7</sup>G 帽子结构的活性，由此推测 Ago2 可能由 miRNA 招募到靶分子 mRNA 的 3'-UTR，与翻译起始复合物竞争性结合 m<sup>7</sup>G 帽子结构，从而抑制翻译起始复合物的形成<sup>[30]</sup>。(3) miRNA 通过阻止 polyA 结合蛋白与 mRNA 结合以阻断翻译起始。Wakiyama 等发现 miRNA 可引发靶分子 mRNA 的脱腺嘌呤反应，使得 mRNA 的 polyA 尾缩短，导致 polyA 结合蛋白与 miRNA 结合受阻，从而影响翻译起始<sup>[31]</sup>。此外，也有研究指出 miRNA 对靶分子 mRNA 的抑制可发生在翻译起始之后。Petersen 等发现，经内部核糖体进入位点起始、不依赖靶分子 mRNA 帽子结构的翻译也能被 miRNA 抑制，表明这种抑制发生在翻译起始之后<sup>[32]</sup>。目前对 miRNA 翻译起始后抑制机制的认识有限，推测其可能与新生多肽链的翻译同步降解、翻译延伸过程核糖体脱落或者翻译提前终止产生的不完整多肽产物迅速降解等因素相关<sup>[32, 33]</sup>。

在动物细胞中，miRNA 除调控翻译抑制外，也可以直接或间接介导靶分子 mRNA 的降解。Wu 等在哺乳动物细胞中发现，miR-125b 和 let-7 可诱导与之不完全配对靶分子 mRNA 的降解，从而调控靶分子的表达水平<sup>[34]</sup>。Giraldez 等在斑马鱼胚胎早期的发育过程中发现 miR-430 可促进其母本来源 mRNA 的降解<sup>[35]</sup>。此外，Ago 蛋白还可位于细胞中降解 mRNA 的 RNA 颗粒中，后者通常包含一些 mRNA 降解酶，提示其可能参与 miRNA 介导的靶分子 mRNA 降解过程<sup>[36, 37]</sup>。

近期研究表明，miRNA 不仅能够负性调控基因表达，在某些条件下 miRNA 也能上调基因表达。Vasudevan 等发现 miRNA 发挥的效应会随着细胞周期的行进而发生改变：在 G<sub>0</sub> 期，miRNA 能够活化翻译过程，从而促进基因表达，而在其他细胞周期中则抑制基因表达<sup>[38]</sup>。其进一步研究表明，miRNA 激活作用与靶分子 mRNA 中富含腺嘌呤和/或尿嘧啶元件 (AU rich element, ARE) 相关。ARE 是位于 mRNA 3'-UTR 的一种不稳定元件，其存在可影响 mRNA 的稳定性，另外，其也是 miRNA 活化翻译的信号：在 miRNA 引导下，miRISC 被招募至 ARE，活化翻译过程、促进



mRNA 的稳定性，从而上调基因表达<sup>[39]</sup>。此外，miRNA 还通过其他机制上调基因表达。Ørom 等发现 miR-10a 与核糖体蛋白编码基因的 mRNA 的 5'-UTR 相结合，促进其翻译，从而增加核糖体的生成，进而调控细胞中总蛋白的合成<sup>[40]</sup>。

### 1.3.2 miRNA 的调控特点

由于 miRNA 较为特殊的作用机制，其调控方式也具有以下特点：首先，miRNA 具有“一对多”和“多对一”的调控方式。由于 miRNA 与靶分子 mRNA 的 3'-UTR 结合位点间存在不完全互补配对的特点，单个 miRNA 通可同时调控数百甚至上千条蛋白编码基因的表达，同一 mRNA 也可能受到多个 miRNA 的共同调控。据生物信息学分析，人类约三分之一的基因可能受到 miRNA 的调控<sup>[41]</sup>。由于 miRNA 的靶分子可能处于不同的信号转导通路中，因此单个 miRNA 的表达量变化即可实现调控细胞内多个蛋白和多条通路的效应，由此，miRNA 是调控细胞生物学行为的关键分子。其次，miRNA 的调控具有“低耗能”和“高效率”的特点。与细胞内另一类反式作用因子（*trans-acting factor*）转录因子相比较，miRNA 为非编码 RNA，无需经历蛋白翻译以及翻译后修饰等过程，合成速率较快，能量消耗较低；miRNA 合成后，无需经历磷酸化修饰等活性调控和核转位等过程，能够直接在亚细胞部位抑制核糖体上的蛋白表达，能够较快地发挥调控作用<sup>[42]</sup>。再次，miRNA 的调控具有“可逆性”。一些 RNA 结合蛋白可能在这一过程中发挥作用：ARE 结合蛋白 HuR 可通过促进 miRISC 与靶分子 mRNA 形成的复合体解离，从而去除 miRNA 的抑制作用<sup>[43]</sup>；RNA 结合蛋白 Dnd1 可通过与 mRNA 是富含尿嘧啶区相结合，屏蔽 miRNA 的结合位点，从而解除 miRNA 的抑制效应<sup>[44]</sup>。

## 2 肿瘤相关的 miRNA：极具临床价值的分子靶标

肿瘤标志物在恶性肿瘤的早期诊断、个体化治疗和预后判断等方面具有重要作用，较常见的肿瘤标志物主要有蛋白酶类、肿瘤特异性抗原、肿瘤代谢产物、激素、癌基因等。目前肿瘤标志物的检测大多存在程序繁杂、特异性不强或灵敏度不高等诸多问题<sup>[45]</sup>，从而限制了其临床应用，因此，寻找新型肿瘤标志物一直是肿瘤研究领域的重要课题。十余年来，世界各地的研究者们通过对大量肿瘤细胞系和临床肿瘤标本进行研究，发现肿瘤中存在一系列表达异常、且发挥促癌或抑癌功能的 miRNA。这些 miRNA 能够参与肿瘤发生和发展过程，在染色体异常、基因突变、基

因多态性和表观遗传学改变等过程中发挥了重要作用，被称为肿瘤相关 miRNA。与肿瘤相关 miRNA 的表达异常和促癌或抑癌功能相对应，miRNA 在临床肿瘤中的研究显示其有望用于监测肿瘤的发生发展和靶向肿瘤治疗。本节将对 miRNA 作为肿瘤的新型生物标志物的研究进展作一概述。

## 2.1 miRNA 临床应用的理论基础

### 2.1.1 肿瘤中 miRNA 表达异常的普遍性

研究表明，在人类多种肿瘤如黑色素瘤、卵巢癌、乳腺癌中，miRNA 定位区域的基因组改变频发。Calin 等通过研究 186 种可能与人类肿瘤发生相关的 miRNA 后发现，其中超过半数的 miRNA 基因位于癌症相关的基因组区域或染色体脆性位点上，并证实肿瘤中表达降低的 miRNA 的基因位点均存在不同程度的删失<sup>[46]</sup>。Volinia 等通过分析包括肺癌、乳腺癌、胃癌、前列腺癌、结肠癌和胰腺癌在内的 540 例实体瘤患者的基因组 miRNA 表达，发现一些通常在正常组织中表达较低的 miRNA 在大多数癌组织中过度表达，如 miR-17-5p、miR-20a、miR-21、miR-92、miR-106a 和 miR-155 等，并证实这些 miRNA 能够靶向抑制某些抑癌基因如 RB1 和 TGFBR2 的表达，提示这些 miRNA 广泛参与了肿瘤的病理过程<sup>[47]</sup>。Zhang 等通过对包括乳腺癌、卵巢癌和黑色素瘤在内的 227 例肿瘤标本中 283 种 miRNA 基因的表达分析，发现多数肿瘤中的 miRNA 基因拷贝数发生了显著变化，其中 41 种 miRNA 的拷贝数变化模式在 3 种肿瘤类型中相一致(26 种拷贝数量增加，15 种拷贝数量减少)，且这些 miRNA 基因组的变化与肿瘤中 miRNA 的表达水平变化相一致<sup>[48]</sup>。以上证据表明，miRNA 表达异常是肿瘤发生和发展过程中的普遍现象，且呈现高度的特异性，这些特点赋予了其作为一类新型肿瘤诊断学证据的价值。

### 2.1.2 miRNA 在肿瘤中发挥抑癌和促癌作用

虽然 miRNA 的表达变化可能通过调控与肿瘤细胞增殖和存活相关的基因表达而参与肿瘤的发生和发展，但这并不意味着所有表达紊乱的 miRNA 均与肿瘤的形成和进展存在直接的因果关系。研究表明，某些 miRNA 可直接参与肿瘤的发生和进展过程，它们的表达异常参与了肿瘤的功能调控，能够发挥促癌和抑癌的作用，其中具有促癌作用的 miRNA 被称为促癌 miRNA (oncogenic miRNA, OncomiRs)，另一类发挥抑癌基因作用的 miRNA 则被称为抑癌 miRNA (tumor suppressor miRNA,

TSmiRs)<sup>[49]</sup>。OncomiRs 在肿瘤中组成性表达升高,能够通过抑制某些重要抑癌基因的表达,促进肿瘤的发生和发展。miR-21 是其中一个典型的 OncomiR,它能够靶向抑癌基因 PTEN 发挥促肿瘤作用。在胶质母细胞瘤、胰腺癌、乳腺癌和肝细胞癌中,miR-21 表达升高,与 PTEN 的表达成负相关,可导致肿瘤增殖和转移<sup>[50]</sup>。与促癌 miRNA 的功能相反,TSmiRs 通过抑制癌基因从而抑制肿瘤的发生发展。let-7 家族成员被认为是一类经典的 TSmiR,它能够靶向调控 KRAS 的表达发挥抑癌功能。在非小细胞肺癌中,let-7 下降可导致 RAS 过表达。在多种肿瘤中,let-7 表达缺失被认为与患者术后生存期缩短密切相关<sup>[51]</sup>。此外,参与肿瘤细胞获得侵袭潜能的 miRNA 被称为转移相关 miRNA (Metastasis-associated miRNA, MetastamiRs)。MetastamiRs 能够调控上皮间质转化 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)、细胞黏附和运动能力的变化等过程,从而发挥促进或抑制转移的作用<sup>[52]</sup>。基于上述概念,在肿瘤治疗中寻找抑制 oncomiRs 表达和恢复 TSmiRs 功能的方法和途径,可能具有良好的临床应用前景。

## 2.2 miRNA 的临床应用

与传统的肿瘤标志物相比,miRNA 主要有检测的损伤小、检测灵敏度高和生物稳定性好等优点,因此可作为肿瘤标志物应用于肿瘤的早期诊断和预后判断。在肿瘤的生物治疗方面,有观点认为肿瘤是一种信号通路疾病,肿瘤细胞通常呈现多条信号转导通路的异常激活或失活,针对单一分子或信号通路的治疗无法治愈肿瘤。由于 miRNA 能够通过抑制多个靶分子表达的同时调控肿瘤的多条信号通路。因此,以 miRNA 为治疗靶点的治疗策略将成为肿瘤生物治疗的新途径。

### 2.2.1 miRNA 用于肿瘤诊断

miRNA 可作为生物标志物用于肿瘤诊断主要基于以下四方面的证据:第一,依据 miRNA 表达谱能较好地区分肿瘤组织与健康组织:正如前文所述,人体正常组织与肿瘤组织的 miRNA 表达谱之间存在较大差异。Maitra 等发现通过检测血清中的 miRNA 表达模式能够较好的区分胰腺癌患者和健康人群<sup>[53]</sup>;Sempere 等通过检测 100 多例乳腺癌患者的石蜡切片组织中的 miRNA 表达,发现其中 miR-145 能够用于乳腺癌的早期诊断<sup>[54]</sup>。第二,依据 miRNA 表达谱能较好地区分肿瘤的组织来源。由于 miRNA 的表达模式具有很好的组织特异性,因此可用于判断肿瘤的组织来源:

Rosenfeld 等通过联合检测组织组织中的 48 个 miRNA 的表达模式, 成功判定了 253 例肿瘤原发和转移组织的组织来源, 其准确率高达 90%<sup>[55]</sup>。Chen 等通过检测肿瘤患者血清中的 miRNA 表达, 能够区分前列腺癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌和卵巢癌等 5 种肿瘤, 提示不同肿瘤具有特征性循环 miRNAs 表达谱, 能够用于肿瘤的诊断和鉴别<sup>[56]</sup>。第三, 依据 miRNA 表达谱能较好地地区分肿瘤的分化程度: 由于 miRNA 的表达在肿瘤发生过程中具有阶段特异性, 因此可用于肿瘤的分子分型和病情监测。Malumbres 等在 B 细胞淋巴瘤中发现同一肿瘤发生发展的不同阶段具有不同的 miRNA 表达谱, 提示 miRNA 可用于检测肿瘤的分化程度和病情进展<sup>[57]</sup>。第四, miRNA 自身的理化特点决定其适合作为分子标志物: miRNA 分子量较小, 不易被 RNA 酶降解, 其在组织或体液中的稳定性较好。Xi 等通过比较石蜡包埋组织中 mRNA 和 miRNA 的表达, 发现 miRNA 较 mRNA 更为稳定, 提示在石蜡保存的组织中检测 miRNA 将更为准确<sup>[58]</sup>。Chen 等的研究表明 miRNA 在血清中可长期稳定存在, 煮沸、反复冻融、酸碱环境、长期保存等均不易造成血清中 miRNA 损失<sup>[56]</sup>。Mitchell 等通过比较肿瘤患者血浆和血清样本的 miRNA 的表达情况, 发现在血浆和血清样本中, miRNA 均可作为基于血液检测的稳定标志物<sup>[59]</sup>。此外, 最近的研究表明 miRNA 在细胞内可被脂质或脂蛋白包裹成外泌体 (Exosome) 分泌至胞外并进入血液, 外泌体中的 miRNA 由于有脂质层的保护, 其表达水平更为稳定, 有望作为一类更好的肿瘤分子标志物检测来源<sup>[60]</sup>。

### 2.2.2 miRNA 用于肿瘤预后判断

由于 miRNA 几乎在人类所有肿瘤类型中表达失调, 越来越多的研究证实 miRNA 能够作为肿瘤的预后标志物。目前, miRNA 作为肿瘤预后判断的生物标志物已在非小细胞肺癌中广泛应用。Yu 等通过对 112 例非小细胞肺癌患者 miRNA 的表达分析, 发现 miR-34a 表达越高, 患者术后复发几率越小; let-7a 表达升高同样也被认为是患者术后预后较佳、生存期延长的保护性指标<sup>[61]</sup>。Yanaihara 和 Makou 等则发现 miR-21 和 miR-155 表达升高是患者预后较差的标志<sup>[62, 63]</sup>。值得指出的是, 由于不同肿瘤类型的 miRNA 表达谱具有其特异性, 其 miRNA 预后标志物的作用也可能不尽相同。如在小细胞肺癌中, 由于 miR-34a 并不与肿瘤的恶性生物学相关, 因而并不能作为预后标志<sup>[64]</sup>。在乳腺癌中, Tavazoie 等发现 miR-335 和 miR-126 与转移性乳腺癌患者的生存期密切相关, miR-335 和 miR-126 在原发灶中的表达越低, 患者疾病复发



的中位时间越短<sup>[65]</sup>。在胃癌中，本实验室李晓华等通过分析 100 例胃癌患者组织中的 miRNA 表达，发现并鉴定出一组 miRNA (miR-10b、miR-21、miR-223、miR-338、let-7a、miR-30a-5p 和 miR-126) 与胃癌预后密切相关<sup>[66]</sup>。

近期研究还显示，miRNA 的生成减少也与肿瘤进展相关联，因此 miRNA 生成过程中的相关分子亦可作为恶性肿瘤的预后标志物。如前文所述，III 型 RNA 核酸内切酶 Droscha 和 Dicer 分别负责 miRNA 成熟前的两次剪切。Karube 等在非小细胞肺癌的一个亚组中发现 Dicer 表达下降与术后病人生存期密切相关，是独立于疾病分期的一个预后判断标志物<sup>[67]</sup>。Merritt 等通过对 111 例卵巢癌患者组织 Droscha 和 Dicer 的表达分析，发现其表达升高被是患者生存期较长、预后较好的标志<sup>[68]</sup>。肿瘤细胞中基因的启动子区的甲基化修饰导致的基因沉默是一种常见现象。Bandres 等发现 miR-9、miR-34a、miR-34b、miR-34c、miR-129 和 miR-137 等启动子区的高甲基化导致这些 miRNA 在结直肠癌中表达沉默，与肿瘤预后密切相关<sup>[69]</sup>。

### 2.2.3 miRNA 用于肿瘤治疗

基于单个 miRNA 能够靶向多个不同基因 mRNA 的调控特性，通过抑制一个 miRNA 的表达，即能影响一组基因的表达，甚至引起多个信号通路的变化，从而发挥基因治疗的效果。由于 miRNA 可具备抑癌和促癌作用，因此可依据其功能开发出两套基于 miRNA 的肿瘤治疗策略：(1) 针对促癌 miRNA 的反向互补抑制策略：由于 miRNA 与其靶分子互补序列的结合是 miRNA 发挥作用的基础，因此，沉默 OncomiRs 的一个合理手段是运用靶向抑制 miRNA 的寡核苷酸序列 (anti-miRNA oligonucleotide, AMO) 阻碍 miRNA 与其靶 mRNA 的结合。AMO 的治疗效果取决于其组织透过能力、对降解的抗性和其在组织器官分布<sup>[70]</sup>。化学修饰能够显著提高 AMO 的稳定性，从而增加其疗效。目前较常见的一种化学修饰 AMO 是锁核酸 (locked nucleic acid, LNA)。LNA 在结构上具有亚甲基桥特征，此构型特征使 LNA 不但可与 DNA 或 RNA 互补形成正常的双螺旋结构，而且其所形成的双链较细胞内正常的 DNA 或 RNA 双链结构更加稳定。LNA 具有较强的稳定性和较低的生物毒性，能够有效转染哺乳动物细胞，发挥有效的反义核酸活性。LNA 突破了早期反义 RNA 技术及 siRNA 技术的局限，为 miRNA 靶向治疗的实现提供了关键技术<sup>[71]</sup>。Liu 等发现 miR-31 在非小细胞肺癌中发挥 OncomiR 的功能，通过利用 LNA 靶向 miR-31 可能是治疗这一肿瘤的可行方法<sup>[72]</sup>。基于 LNA 的 miR-122 抑制剂 Miravirsin (SPC3649)

是首个进入人体临床试验的 miRNA 靶向疗法，其用于治疗丙肝已在 II a 期临床试验中显示出了巨大潜力<sup>[73]</sup>。除 AMO 外，miRNA 的小分子抑制剂也在肿瘤治疗中显示出了较大的前景。目前已开发出了多种针对促癌 miRNA 的小分子抑制剂，如 azobenzene 是针对 miR-21 生成的有效抑制剂<sup>[74]</sup>。可以预见，miRNAs 抑制剂与化疗药物联用可能成为肿瘤分子靶向治疗的新方向。(2) 针对抑癌 miRNA 的恢复或替换策略：既然抑癌基因能够抑制肿瘤生长，那么理论上恢复 TSmiRs 的功能也应具有抗肿瘤效果。基于此种设想，miRNA 替换疗法的实施则依赖于应用病毒投递系统进行基因恢复或应用 miRNA 模拟物替代表达。Trangdeng 等将 let-7 和 miR-34a 的模拟物制作成新型中性脂性乳剂用于在裸鼠非小细胞肺癌模型中被证实发挥了治疗效果<sup>[75]</sup>。另外，Kumar 等通过应用慢病毒投递系统过表达 let-7，发现其能使小鼠移植瘤模型中的肿瘤体积变小和增长减慢<sup>[76]</sup>。

虽然 miRNA 用于临床肿瘤治疗具有良好的应用前景，但尚处于基础性实验研究阶段，仍然面临一些问题。例如，由于 miRNA 可以调控与之不完全配对的靶分子的表达，因此，运用 miRNA 模拟物替代治疗策略时可能会产生脱靶效应。另外，如何开发高效的 miRNA 的体内传递系统也是研究的另一个难点。使用脂质体介质的传递效率较低且可能诱发机体的炎症反应；病毒载体感染效率高，但病毒蛋白亦可能引起机体的免疫反应；纳米颗粒载体可减少炎症反应，但传递效率较低且疗效较短。可见，更为高效、安全的传递系统仍有待进一步研究。更为重要的是，虽然现阶段越来越多的研究揭示了部分肿瘤相关 miRNA 的功能，但这些 miRNA 的分子作用机制尚不明确或不完全明确。由于 miRNA 的改变会引起细胞内多个基因和信号通路的改变，因此，在 miRNA 疗法应用于临床前，必须明确认识其作用靶点以及其与细胞内信号通路的相互关系。

综上所述，基于 miRNA 在肿瘤发生发展过程中的重要调控作用与其作为新型肿瘤标志物和治疗靶点的良好临床应用前景，系统研究 miRNA 在肿瘤中的功能与分子机制既是关联 miRNA 基础研究与临床应用的关键环节，也是薄弱环节。另一方面，由于胃癌因人种和地理环境的不同，其发病率在世界范围内存在较大差异，胃癌在我国及一些亚洲国家的发病率明显高于西方国家，因此，对胃癌发生发展机制的研究必须依靠我国的自主科研和自主创新力量。可见，研究胃癌相关的 miRNA 势在必行，miRNA 在胃癌中的作用及其分子机制还有待于进一步的挖掘和探索。

# 正文

## 第一部分 miR-7 在胃癌细胞和胃癌组织中的表达模式及其临床意义

近年研究表明 miRNA 的表达失调促进了肿瘤的发生和发展,但目前对胃癌相关 miRNA 的认识仍然有限。本研究聚焦 miR-7 在胃癌中的表达和功能,并深入探讨其调控胃癌发生和发展的分子机制。本部分研究首先在胃上皮和癌细胞系及胃癌组织标本中检测了 miR-7 的表达情况,并分析了 miR-7 表达水平与胃癌各病理参数间的相关性,初步探讨了 miR-7 在胃癌发生和发展过程中可能发挥的作用。

### 1 材料

#### 1.1 细胞系

人胃腺癌细胞系 AGS、BGC823 和 SGC7901 引自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,人胃腺癌细胞系 MKN28 和 MKN45 引自中国人民解放军军事医学科学院,人胃粘膜上皮细胞系 GES 引自北京市肿瘤防治研究所,以上细胞系均由肿瘤生物学国家重点实验室组织细胞库保存。

#### 1.2 组织标本

本研究中临床标本的采集和使用已获得西京医院伦理委员会的审批和患者的知情同意。本研究中使用的胃癌新鲜组织标本取自西京医院进行胃大部切除手术的胃癌患者,患者术前均未接受化学药物或放射治疗。本研究共收集标本 40 例,实际可用 30 例,包括 20 例配对的胃癌组织与其远端非癌组织标本,10 例配对的胃癌原发组织、胃癌转移淋巴结组织和其原发灶远端非癌组织标本。从术中切除的胃组织中留取两块组织样本,分别为肿瘤组织与距肿瘤组织 3-5 cm 的远端配对的非肿瘤组织,

其中 10 例留取了配对的淋巴结组织。取材后，每份组织分为两个部分，一部分在于离体 10 min 内保存于液氮中，用于提取总 RNA 或蛋白质进行后续研究；另一部于福尔马林溶液中保存，用于病理诊断。所有病例均经西京医院病理科确诊为胃癌，患者个人信息和临床病理资料均通过病理科档案记录查获。本研究使用的胃癌组织芯片分别购自上海芯超生物科技有限公司和陕西超英生物科技有限公司。

### 1.3 主要试剂

细胞培养基	Hyclone 公司
胎牛血清	Hyclone 公司
胰蛋白酶	Hyclone 公司
miRNeasy Mini Kit	Qiagen 公司
TaqMan MicroRNA Assay	AB 公司
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	AB 公司
TaqMan Fast Advanced Master Mix	AB 公司
LNA microRNA probe (double-DIG labeled)	Exiqon 公司
LNA microRNA ISH Optimization Kit	Exiqon 公司

### 1.4 主要仪器

CO <sub>2</sub> 细胞培养箱	Thermo 公司
超净工作台	Thermo 公司
超低温冰箱	Thermo 公司
光学显微镜	Olympus 公司
台式高速离心机	Eppendorf 公司
纯水仪	Millipore 公司
组织破碎仪	Qiagen 公司
微量紫外分光光度计	Thermo 公司
普通 PCR 仪	AB 公司
实时定量 PCR 仪 (LightCycler 480)	Roche 公司
原位杂交仪	Labnet 公司



## 2 方法

### 2.1 细胞培养

复苏人胃腺癌细胞系 AGS、BGC823、SGC7901、MKN28、MKN45、MKN28NM、MKN28M、GC9811、GC9811-P 和人胃粘膜上皮细胞系 GES，分别培养于指定培养基。

### 2.2 细胞和组织总 RNA 的提取

#### 2.2.1 总 RNA 的提取

- 1) 组织和细胞的均质化：每 50 mg 组织加入 QIAzol 试剂 700  $\mu$ l，置于离心管中，用组织破碎仪将组织样本均质；各贴壁生长的细胞系在 6 孔板中长至 80% 融合时，每孔加入 QIAzol 试剂 700  $\mu$ l，使用移液器吸打裂解液数次，以促进细胞裂解。
- 2) 三相分离：室温孵育均质化的样本 5 min，每 700  $\mu$ l QIAzol 试剂加入 140  $\mu$ l 氯仿；将样本管完全盖紧后，剧烈振荡管体 15 sec，室温孵育 3 min；离心样本 15 min (4 $^{\circ}$ C, 12000 $\times$ g)。
- 3) 沉淀 RNA：将无色的上层水相转移到新管中，加入 1.4 倍体积的无水乙醇，混匀后吸取至 RNeasy Mini 过滤管中，离心 30 sec (室温, 12000 $\times$ g)。
- 4) 清洗 RNA：移去滤过液，在过滤管中加入 700  $\mu$ l RWT 液，离心 30 sec (室温, 12000 $\times$ g)，重复此步骤 3 次；移去滤过液，在过滤管中加入 500  $\mu$ l RPE 液，离心 30 sec (室温, 12000 $\times$ g)，重复此步骤 3 次。
- 5) 溶解 RNA：空气干燥 RNA 沉淀 5 min；加入无 RNA 酶的水 30  $\mu$ l，离心 30 sec (室温, 12000 $\times$ g)；收集滤过的 RNA 溶液，贮存于 -80 $^{\circ}$ C。

#### 2.2.2 RNA 浓度和质量的检测

取 2  $\mu$ l 各样本 RNA 溶液，使用微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度和 A260/A280 比值。

### 2.3 实时定量 PCR 检测细胞和组织中 miR-7 的表达

#### 2.3.1 逆转录

- 1) 按照以下剂量配制逆转录反应液：

Component	Volume
dNTP mix (100 mM)	0.15 $\mu$ l
Multiscribe RT enzyme (50 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10 $\times$ RT Buffer	1.5 $\mu$ l
RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)	0.19 $\mu$ l
Nuclease free water	4.16 $\mu$ l
RT primer	3 $\mu$ l
RNA sample	5 $\mu$ l
Total	15 $\mu$ l

2) 逆转录反应程序: 16 $^{\circ}$ C, 30 min; 42 $^{\circ}$ C, 30 min; 85 $^{\circ}$ C, 5 min。

### 2.3.2 实时定量 PCR

1) 按照以下剂量配制 PCR 反应液:

Component	Volume
TaqMan Fast Advanced Master Mix (2 $\times$ )	10 $\mu$ l
TaqMan Gene Expression Assay (20 $\times$ )	1.0 $\mu$ l
cDNA template	2.0 $\mu$ l
Nuclease free water	7.0 $\mu$ l
Total	20.0 $\mu$ l

2) 实时定量 PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C, 20 sec; 95 $^{\circ}$ C, 1 sec; 60 $^{\circ}$ C, 20 sec; 60 个反应循环。

### 2.3.3 数据处理和统计分析

以 U6 snRNA 基因为内参, 通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法分析实时定量 PCR 数据, 获得 miR-7 的相对表达量。用 SPSS (V17.0) 对数据进行统计分析, 使用配对  $t$  检验比较两样本间 miR-7 的表达差异。  $P < 0.05$  视为有统计学意义。

## 2.4 组织原位杂交检测组织芯片中 miR-7 的表达

### 2.4.1 组织原位杂交

1) 常规脱蜡复水: 先将组织芯片置于二甲苯中 5 min, 重复 3 次; 再将其依次置于 99.9%、96% 和 70% 的乙醇中 10 min, 重复 3 次; 最后将其置于 PBS 中, 漂洗 5

min。

- 2) 蛋白酶 K 孵育：在每张组织芯片上滴加约 300  $\mu$ l 蛋白酶 K 溶液，置于 37 $^{\circ}$ C 杂交炉中孵育 10 min；去除蛋白酶 K 溶液，使用 PBS 漂洗 5 min，重复 2 次。
- 3) 组织芯片脱水：将组织芯片依次置于 70 %、96 % 和 99.9 % 的乙醇中 10 min；随后将芯片置于清洁空气中，风干 15 min。
- 4) 组织芯片杂交：在每张组织芯片上滴加约 25  $\mu$ l 杂交液（含 1 nM LNA U6 snRNA 探针和 40 nM 双地高辛标记的 LNA miR-7 探针），用洁净的盖玻片复盖；95 $^{\circ}$ C 变性 8 min 后，立即将组织芯片置于冰上复性，置于 55 $^{\circ}$ C 杂交炉中孵育约 18 hr。
- 5) 杂交后洗：移去盖玻片，依次将组织芯片置于 60 $^{\circ}$ C 的 5 $\times$ 、1 $\times$  和 0.2 $\times$  的 SSC 溶液中漂洗 5 min；随后将芯片置于室温的 PBS 中漂洗 1 次。
- 6) 封闭：将芯片置于湿盒中，滴加封闭液，室温孵育 15 min。
- 7) 免疫组织化学检测：去除封闭液，滴加抗地高辛一抗，于室温孵育 1 hr；随后使用 TBS-T 溶液漂洗 3 min，重复 3 次；滴加新鲜配置的酶标二抗，于 30 $^{\circ}$ C 孵育 2 hr；随后使用 KTBST 溶液漂洗 5 min，重复 2 次，以终止反应；使用去离子水漂洗 1 min，重复 2 次；在组织芯片上滴加约 200  $\mu$ l Nuclear Fast Red 溶液，孵育 1 min，进行细胞核染色；最后流水冲洗组织芯片 10 min。
- 8) 脱水、封片：将组织芯片依次置于 70 %、96 % 和 99.9 % 的乙醇中 10 min；滴加封片液，使用中性树脂胶封片。

#### 2.4.2 组织芯片 ISH 结果判读标准和统计分析

组织芯片 ISH 结果由两名病理科医师独立阅片判读，采用免疫反应积分法对免疫组织化学反应进行半定量评分。阳性细胞百分比分为 5 级：阴性计 0 分，<10% 计 1 分，11%-50% 计 2 分，51%-80% 计 3 分，>80% 计 4 分；染色强度分为 4 级：未见阳性细胞计 0 分，弱阳性计 1 分，中等阳性计 2 分，强阳性计 3 分。将阳性细胞百分比 $\times$ 染色强度即为评分数，评分数 $>4$  者判读为 miR-7 高表达， $<4$  者判读为 miR-7 低表达。使用 SPSS (V17.0) 对数据进行统计分析，使用 Kaplan-Meier 法分析 miR-7 表达高低与胃癌患者生存期间的关系，使用 Cox 回归分析 miR-7 表达高低与胃癌各病理参数的相关性。 $P<0.05$  视为有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 miR-7 在胃癌细胞和胃癌组织中的表达模式

以胃粘膜正常上皮来源的细胞系 GES 为对照, 利用实时定量 PCR 方法检测 miR-7 在胃癌细胞系 AGS、SGC7901、MKN28 和 MKN45 中的表达情况。结果表明, miR-7 在 4 种胃癌细胞系中的表达均低于胃粘膜正常细胞系 (图 1-1A)。以胃癌低转移潜能细胞株 GC9811 和 MNK28NM 为对照, 利用实时定量 PCR 检测 miR-7 在胃癌高转移潜能细胞株 GC9811-P 和 MKN28M 中的表达情况。结果表明, miR-7 在胃癌高转移潜能细胞中的表达低于胃癌低转移潜能细胞 (图 1-1B)。在 10 例发生淋巴结转移的胃癌组织样本中, 以配对的胃癌原发灶肿瘤组织为对照, 利用实时定量 PCR 检测 miR-7 表达, 结果表明: miR-7 在胃癌原发组织中的表达水平低于癌旁非癌组织, 而胃癌淋巴结转移组织中的表达进一步低于胃癌原发组织 (图 1-1C)。上述结果表明, 在多数胃癌细胞和胃癌组织中, miR-7 的表达低于正常胃上皮细胞和组织, 且在胃癌高转移潜能细胞株和胃癌淋巴结转移灶中表达进一步降低。

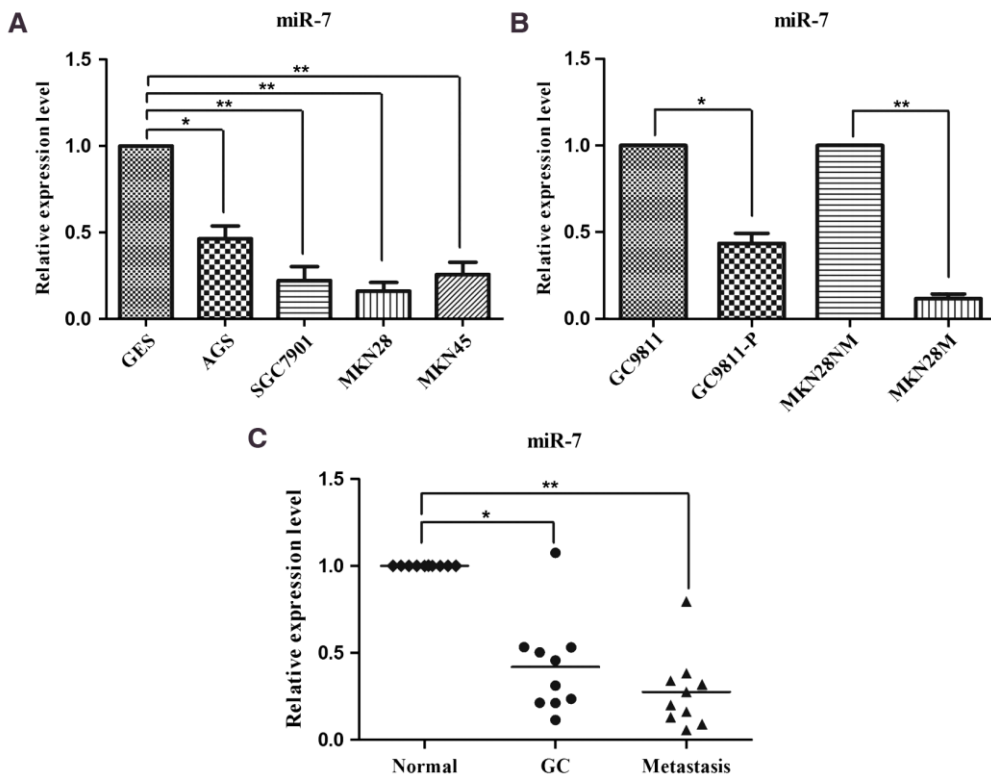


图 1-1 miR-7 在胃癌细胞和临床组织标本中的表达

A: miR-7 在胃上皮细胞 GES 和 4 种胃癌细胞 AGS、SGC7901、MKN28 和 MKN45

中的表达；**B**：miR-7 在高转移胃癌细胞系 GC9811-P 和 MKN28M 及其对应低转移胃癌细胞 GC9811 和 MKN28NM 中的表达；**C**：miR-7 在取自 10 例胃癌患者的匹配的癌旁非肿瘤组织、原发灶肿瘤组织和淋巴结转移组织中的表达。

### 3.2 miR-7 表达与胃癌分级、分期的相关性

使用胃癌组织芯片，利用 ISH 检测胃癌组织中 miR-7 的表达。结果表明，miR-7 在胃癌组织中的表达阳性率为 94.6% (230/243 例)。进一步分析胃癌组织病理参数与 miR-7 表达的相关性，发现 miR-7 的表达与肿瘤的大小、分级和 TNM 分期呈负相关，与患者的性别和年龄不具有相关性（表 1-1）。

表 1-1 miR-7 在 106 例胃癌组织中的表达与临床病理参数的关系

Variables	miR-7 Expression			P value
	All cases (n=106)	Low expression (n=67)	High expression (n=39)	
<b>Gender</b>				
Male	67	50	17	0.652
Female	39	27	12	
<b>Age (years)</b>				
≤57.1 ¶	55	38	16	0.515
>57.1	51	39	12	
<b>Tumor size (cm)</b>				
≤5	51	30	21	0.002
>5	55	47	8	
<b>Differentiation</b>				0.007
Grade 1	6	1	5	
Grade 2	46	35	11	
Grade 3	54	41	13	
<b>TNM Stage §</b>				0.000
I	13	2	11	
II	17	7	10	
III	66	60	6	
IV	7	7	0	

¶ 手术时患者的平均年龄。

§ 其中 3 例患者的数据删失。

Kaplan-Meier 生存分析表明，miR-7 的表达与患者的无疾病生存期呈负相关（图 1-3）。

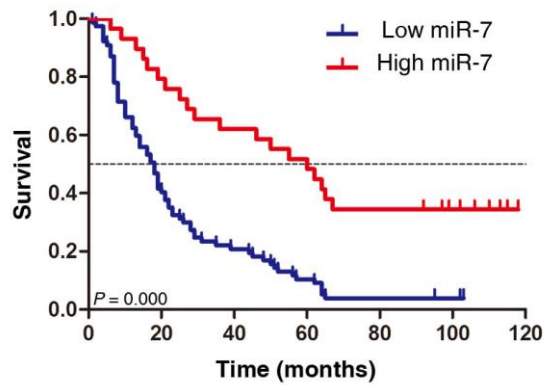


图 1-3 miR-7 表达水平与胃癌患者术后生存时间的 Kaplan-Meier 分析曲线

Cox 回归分析表明，miR-7 的表达水平可作为胃癌患者预后的独立影响因素（表 1-2）。上述结果表明，miR-7 表达水平随胃癌恶性程度增加而减低，提示其与胃癌发生和发展密切相关。

表 1-2 基于 COX 比例风险回归模型的多因素生存分析

Variables	Case number	HR (95% CI)	P value
<b>Univariate analysis</b>			
Gender (Male vs Female)	67/39	0.88 (0.58-1.34)	0.558
Age (>57.1 vs ≤57.1)	51/55	1.74 (1.16-2.63)	0.008
Tumor Size (>5 vs ≤5)	55/51	1.77 (1.17-2.67)	0.007
Grade of differentiation (Grade 3 vs Grade 1/2)	53/52	1.50 (0.99-2.27)	0.053
TNM (I/II vs III/IV)	73/30	2.93 (1.78-4.83)	0.000
miR-7 (high vs low)	29/77	2.82 (1.70-4.67)	0.000
<b>Multivariate analysis</b>			
Age (>57.1 vs ≤57.1)	51/55	1.73 (1.13-2.66)	0.011
Tumor Size (>5 vs ≤5)	55/51	1.07 (0.68-1.70)	0.770
Grade of differentiation (Grade 3 vs Grade 1/2)	53/52	1.32 (0.86-2.02)	0.208
TNM (I/II vs III/IV)	73/30	2.21 (1.26-3.89)	0.006
miR-7 (high vs low)	29/77	1.93 (1.15-3.24)	0.014

## 4 讨论

2001年, Lagos-Quintana 等首次在黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中发现了 miR-7 的表达<sup>[77]</sup>。近年来, miR-7 基因被证实存在于大多数非对称动物(urbilateria)的基因组中, 并且具有高度的进化保守性<sup>[78]</sup>, 提示其在生物体内可能发挥重要的功能。在人体细胞内, miR-7 由基因组内 3 个不同位点的基因编码: MIR7-1 基因系 9 号染色体 HNP1K 基因中的内含子 miRNA 编码基因, 编码 pri-miR-7-1; MIR7-2 基因位于 15 号染色体, 编码 pri-miR-7-2; MIR7-3HG 基因位于 19 号染色体, 编码 pri-miR-7-3。以上 3 个基因的编码产物经转录加工后均能生成相同的成熟 miR-7 序列, 但 MIR7-1 基因编码产物的丰度为后两者的约 100 倍<sup>[79]</sup>。人体内 miR-7 的表达具有一定的组织特异性, 部分研究显示其在大脑、脾脏和胰腺组织中表达较丰富<sup>[80]</sup>, 但目前未见有在人体组织中横向比较 miR-7 表达水平的报道。

2008 年, Kefas 等首次在神经胶质瘤中报道 miR-7 在肿瘤细胞中较正常脑组织表达降低<sup>[81]</sup>。随后, 陆续有研究报道了 miR-7 在乳腺癌<sup>[82]</sup>、舌癌<sup>[83]</sup>、肺癌<sup>[84]</sup>、肝癌<sup>[85]</sup>、黑色素瘤<sup>[86]</sup>、宫颈癌<sup>[87]</sup>及结肠癌<sup>[88]</sup>等恶性肿瘤中表达下调。然而, 也有少数研究报道 miR-7 在某些肿瘤类型中表达上调, 譬如某些细胞类型的肺癌<sup>[89]</sup>和肾细胞癌<sup>[90]</sup>。尽管彼时对于肿瘤中的 miR-7 有了一定的认识, 但关于胃癌中 miR-7 的研究极少, 仅有 Wu 等利用 miRNA 表达谱芯片筛选发现 miR-7 在对羟基喜树碱耐药的胃癌细胞中表达降低的报道<sup>[91]</sup>。在本实验室的前期研究中, 我们通过基因芯片比对胃癌高低转移潜能细胞系 GC9811-P 和 GC9811 的 miRNA 表达谱, 发现 miR-7 在高转移潜能细胞 GC9811-P 中的表达较低转移潜能细胞 GC9811 显著降低, 提示其在胃癌的发生和发展中可能发挥抑癌基因的作用。由于胃癌是我国发病率最高的消化系统恶性肿瘤, 且 miR-7 在多种肿瘤类型中表达下调, 提示其可作为潜在的抗癌治疗靶点, 因此, 研究 miR-7 在胃癌中的表达、功能和分子机制将为其用于胃癌临床治疗提供理论基础。

在本部分的研究中, 我们首先在广泛使用的胃上皮细胞 GES 和多种胃癌细胞系中检测 miR-7 的表达, 发现 miR-7 在胃癌细胞中表达降低; 在本实验室前期建立的两对胃癌高低转移潜能细胞系中, 发现 miR-7 在胃癌高转移细胞系中的表达较低转移胃癌细胞进一步降低, 这一结果也与我们前期的胃癌高低转移潜能细胞系 miRNA

表达谱芯片结果相互印证。明确 miR-7 在胃癌细胞系中的表达模式后，我们的结论需要在临床标本进行验证。通过对 29 例胃癌患者的手术切除标本中 miR-7 检测，我们发现：在多数胃癌组织中，miR-7 的表达水平低于癌旁非肿瘤组织，且随胃癌分级程度的增高而降低；在胃癌淋巴结转移组织中，miR-7 的表达进一步低于胃癌原发灶肿瘤组织。为进一步揭示 miR-7 的临床意义，我们在包含较大样本量的胃癌组织芯片中，利用原位杂交方法检测了 miR-7 的表达。通过分析 miR-7 的表达水平与胃癌临床病理参数间的关系，我们发现 miR-7 表达降低的程度与胃癌的临床分期以及胃癌患者的生存期和预后密切相关。

已有研究初步表明，由于肿瘤中 miRNA 表达异常，且在组织和血清中较为稳定，因此有望成为新型的临床肿瘤标志物，用于肿瘤的诊断和预后判断<sup>[92]</sup>。miR-7 是否可以作为胃癌诊断和预后判断的分子标志物，还有待更大量的胃癌样本和更严密的流行病学研究予以验证，我们现有的结果为深入研究 miR-7 在胃癌诊断和预后判断中的价值提供了初步线索。另一方面，由于 miRNA 可作为原癌基因或抑癌基因在肿瘤的发生和发展中发挥调控作用，从而使得通过导入与抑癌 miRNA 具有类似作用的外源性 miRNA 模拟物实现抑制肿瘤生长或诱导肿瘤细胞凋亡的新型肿瘤治疗手段成为可能<sup>[75]</sup>。因此，研究 miR-7 在胃癌治疗中的潜在价值，就必须明确 miR-7 在胃癌发生和发展过程中所发挥的作用，这就要求我们首先通过建立体外细胞模型和裸鼠体内肿瘤模型，对 miR-7 在胃癌中的功能进行初步研究。



## 第二部分 miR-7 在胃癌细胞恶性生物学行为中的功能研究

本文第一部分已证实 miR-7 在胃癌细胞和组织中表达降低，且在胃癌高转移潜能细胞和胃癌转移组织中表达进一步下降，提示其可能在调控胃癌恶性生物学行为中发挥重要作用。在本部分实验中，分别通过上调和下调 miR-7 在胃癌细胞中的表达，从功能获得和功能缺失两个角度，在体外和体内观察了 miR-7 对胃癌细胞各表型的影响，从而明确了其在胃癌细胞恶性生物学行为中的功能。

### 1 材料

#### 1.1 载体

商品化的 miR-7 过表达和干扰慢病毒载体购自上海吉凯基因化学技术有限公司。

#### 1.2 细胞系

人胃粘膜上皮细胞系 GES、人胃腺癌细胞系 BGC823 和 SGC7901 来源同第一部分 1.1；人胃腺癌高低转移潜能细胞系 GC9811 和 GC9811-P 由本实验室建系保存。

#### 1.3 实验动物

6-8 周龄雌性 BALB/C 裸鼠购自第四军医大学实验动物中心。

#### 1.4 主要试剂

细胞培养基	Hyclone 公司
胎牛血清	Hyclone 公司
胰蛋白酶	Hyclone 公司
Opti-MEM 培养基	Hyclone 公司
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen 公司
miRNA mimic、inhibitor 及阴性对照	Invitrogen 公司
MTT	Sigma 公司

二甲基亚枫	Sigma 公司
Transwell 小室	Corning 公司
Matrigel 凝胶	BD 公司
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	AB 公司
TaqMan Fast Advanced Master Mix	AB 公司

## 1.5 主要仪器

CO <sub>2</sub> 细胞培养箱	Thermo 公司
超净工作台	Thermo 公司
超低温冰箱	Thermo 公司
光学显微镜	Olympus 公司
台式高速离心机	Eppendorf 公司
纯水仪	Millipore 公司
多功能酶标仪	Thermo 公司
流式细胞仪	BD 公司
GelCount Colony Counter	Oxford Optronix 公司
普通 PCR 仪	AB 公司
实时定量 PCR 仪	AB 公司

## 2 方法

### 2.1 构建 miR-7 功能获得和功能缺失细胞模型

#### 2.1.1 miR-7 mimic 和 miR-7 inhibitor 的瞬时转染

- 1) 接种细胞：使用胰蛋白酶细胞细胞，制备单细胞悬液，接种至 6 孔板，每孔细胞数约为  $2 \times 10^5$  个。
- 2) 更换培养基：待细胞在 6 孔板中的生长融合度至约 30% 时，将培养基更换为 Opti-MEM 培养基。
- 3) 配置转染液：使用无菌的离心管，按相应比例将 Opti-MEM 分别与 miR-7 mimic、miR-7 inhibitor 及其相应阴性对照混匀；另取一只离心管，按相应比例将 Opti-MEM 与 Lipofectamine RNAiMAX 混匀；两管室温孵育 5 min 后，混合均匀，

室温孵育 20 min。

4) 转染细胞：将上述混合液缓慢加入相应 6 孔板中，48 hr 后换为相应正常培养基。

### 2.1.2 miR-7 过表达和 shRNA 慢病毒载体的稳定表达细胞系的构建

1) 接种细胞：胰蛋白酶细胞细胞，制备单细胞悬液，接种至 6 孔板，每孔细胞数约为  $2 \times 10^5$  个。

2) 确定病毒滴度：按复感染指数 (multiplicity of infection, MOI) 计算所需病毒数量。

3) 慢病毒感染：待细胞生长融合度至约 30% 时，将病毒液滴加至培养基；混和均匀后，置于培养箱中继续培养；48 hr 更换新鲜培养基；96 hr 在荧光显微镜下观察细胞中绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 的表达情况。

4) 细胞扩增：依次在不同规格的培养皿和培养瓶中扩增细胞。

5) 细胞分选：消化细胞，制备单细胞悬液，200 目滤网过滤；使用流式细胞仪分选其中 GFP 表达较强的细胞；将分选所得细胞进一步扩增、建系。

### 2.1.3 实时定量 PCR 确定转 (感) 染效率

方法同第一部分 2.3。

## 2.2 过表达或沉默 miR-7 后的体外功能实验

### 2.2.1 MTT 检测细胞生长曲线

1) 接种细胞：取转 (感) 染后对数生长的细胞，胰蛋白酶消化，制备单细胞悬液，接种至 5 块 48 孔板，按分组每组设置 5 个重复，每孔细胞数约为  $3 \times 10^3$  个。

2) 加入 MTT：每隔 24 hr 取出其中 1 块 48 孔板，每孔加入 20  $\mu$ l MTT 溶液 (5 mg/ml)；置于细胞培养箱孵育 4 hr。

3) 加入二甲基亚砷：移除每孔中的液体，加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砷；室温轻微震荡 10 min 以溶解甲臞产物。

4) 测定吸光度：使用酶标仪于波长 570 nm 测定各孔吸光度值；以时间为横轴、吸光度值为纵轴绘制细胞生长曲线。

### 2.2.2 平板集落形成实验

1) 接种细胞：取转 (感) 染后对数生长的细胞，胰蛋白酶消化，制备单细胞悬液，接种至 6 孔板，按分组每组设置 3 个重复，每孔细胞数约为  $1 \times 10^3$  个；接种细

胞后，轻微摇晃培养板使细胞均匀分布；直至在细胞培养箱中连续培养至形成肉眼可见集落。

- 2) 固定细胞：移除培养基，PBS 漂洗 3 次；每孔加入甲醇 2 ml，固定 15 min；移除甲醇，PBS 漂洗 3 次。
- 3) 细胞染色：每孔加入结晶紫染色液 2 ml，染色 15 min；移除结晶紫染色液，将培养板置于流水下冲洗去除未结合细胞的染色液；在清洁空气中干燥。
- 4) 集落计数：使用 GelCount 集落计数分析系统检测每孔集落形成数量并扫描成相。

### 2.2.3 软琼脂集落形成实验

- 1) 制备底层琼脂：配置 5% 的琼脂凝胶溶液，置于沸水浴中完全融化；取 1 体积移入无菌烧杯中冷却至约 50℃ 时，加入 9 体积预温至 37℃ 的培养基；充分混匀后，取 1 ml 浇注 12 孔板，置于室温凝固。
- 2) 制备细胞悬液：取转（感）染后对数生长的细胞，胰蛋白酶消化，制备单细胞悬液，调整细胞密度至约  $5 \times 10^2$ /ml。
- 3) 制备上层琼脂：取 9 体积预温于 37℃ 的细胞悬液，加入 1 体积冷却至 50℃ 的 3.3% 琼脂凝胶溶液；充分混匀后，取 1 ml 浇注于底层琼脂上，置于室温凝固；常规培养 2 周。
- 4) 集落计数：使用 GelCount 集落计数分析系统检测每孔集落形成数量并扫描成相。

### 2.2.4 流式细胞术测定细胞周期

- 1) 接种细胞：取对数生长的细胞，胰蛋白酶消化，制备单细胞悬液，接种至 6 孔板，每孔细胞数约为  $2 \times 10^5$  个；待细胞贴壁后，进行细胞转染。
- 2) 诱导细胞周期同步化：细胞转染 48 hr 后，从培养基中撤离血清，培养 24 hr。
- 3) 固定细胞：胰蛋白酶消化细胞，制备单细胞悬液；用预冷至 4℃ 的 PBS 洗涤后离心 5 min (4℃,  $1000 \times g$ )，重复离心 3 次；加入预冷的 70% 乙醇 (PBS 配制)，4℃ 固定过夜。
- 4) 细胞染色：离心收集细胞，以预冷的 PBS 漂洗细胞 1 次；加入预冷的 PBS 重悬细胞，调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /ml；取 100  $\mu$ l 细胞悬液，加入 0.5% 碘化丙啶 (PI) 综合染色液 (PI 50  $\mu$ g/ml；RNase A 1  $\mu$ g/ml)；混匀后，37℃ 水浴 30 min。
- 5) 流式细胞仪检测：300 目尼龙网过滤后，使用流式细胞仪在 488 nm 激发波波长下测定细胞各周期 DNA 含量。

### 2.2.5 流式细胞术测定细胞凋亡

- 1) 接种细胞: 取对数生长的细胞, 胰蛋白酶消化, 制备单细胞悬液, 接种至 6 孔板, 每孔细胞数约为  $2 \times 10^5$  个; 待细胞贴壁后, 进行细胞转染或添加化学药物处理。
- 2) 细胞染色: 将处理后的细胞用胰蛋白酶消化, 制备单细胞悬液; 用预冷至  $4^\circ\text{C}$  的 PBS 洗涤后离心 5 min ( $4^\circ\text{C}$ ,  $1000 \times g$ ), 重复离心 3 次; 将细胞重悬于 200  $\mu\text{l}$  结合缓冲液, 加入 10  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{l}$  PI 染色液; 混匀后,  $37^\circ\text{C}$  水浴 30 min。
- 3) 流式细胞仪检测: 加入 300  $\mu\text{l}$  结合缓冲液后, 使用流式细胞仪在 515 nm 激发光波波长下检测 FITC 荧光, 另用大于 560 nm 波长检测 PI 荧光。

### 2.2.6 Transwell 细胞迁移实验

- 1) 制备单细胞悬液: 取转(感)染后处于对数生长期的细胞, 胰蛋白酶消化, 使用含 10% BSA 的培养基重悬细胞, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。
- 2) 设置 Transwell 小室: 将滤膜孔径为 8  $\mu\text{m}$  的 Transwell 小室放置于 24 孔板中; 在小室外加入 600  $\mu\text{l}$  含 10% 血清的培养基; 在小室内加入 100  $\mu\text{l}$  细胞悬液; 将培养板放入孵箱, 常规培养 24-48 hr。
- 3) 细胞固定及染色: 取出小室, 用 PBS 淋洗 3 次; 将小室置于 95% 乙醇中固定 5 min; 在 0.5% 结晶紫染色液中染色 10 min 后, 用 PBS 漂洗去除未结合细胞的染色液。
- 4) 细胞计数: 用棉签轻拭去小室滤膜上层的细胞, 在显微镜下观察滤膜下层细胞, 每个样本随机选取 10 个视野拍照并计数。

### 2.2.7 Transwell 细胞侵袭实验

- 1) 配置 Matrigel 凝胶: 将 Matrigel 凝胶置于  $4^\circ\text{C}$  过夜; 次日将液化的 Matrigel 与培养基以 1: 6 的比例稀释。
- 2) 包被基底膜: 将滤膜孔径为 8  $\mu\text{m}$  的 Transwell 小室放入 24 孔板中; 在小室内加入 50  $\mu\text{l}$  Matrigel 稀释液, 以包被滤膜; 将培养板置于孵箱中 4 hr, 令包被液晾干。
- 3) 剩余步骤同 Transwell 细胞迁移实验。

## 2.3 过表达或沉默 miR-7 后的体外功能实验

### 2.3.1 裸鼠移植瘤实验

- 1) 制备细胞悬液: 选取稳定感染慢病毒载体后处于对数生长期的细胞, 胰蛋白酶消

化；使用 PBS 重悬细胞后计数；收集细胞沉淀，使用生理盐水重悬细胞，将细胞密度调整为约  $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。

- 2) 注射细胞悬液：将裸鼠注射部位皮肤使用医用酒精消毒；使用无菌注射器吸取 200  $\mu\text{l}$  细胞悬液，注射入裸鼠皮下。
- 3) 测量、记录瘤体数据：裸鼠由第四军医大学动物实验中心饲养；饲养期间定期测量移植瘤的瘤体体积、裸鼠体重和健康状态；约 4 周后处死裸鼠，剥离肿瘤组织，测量肿瘤的体积、重量；固定肿瘤，石蜡包埋，切片。

### 2.3.2 裸鼠转移瘤实验

- 1) 制备细胞悬液：选取稳定感染慢病毒载体后处于对数生长期的细胞，胰蛋白酶消化；使用 PBS 重悬细胞后计数；收集细胞沉淀，使用生理盐水重悬细胞，将细胞密度调整为约  $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。
- 2) 注射细胞悬液：将裸鼠尾部皮肤使用医用酒精消毒；使用无菌注射器吸取 200  $\mu\text{l}$  细胞悬液，注射入裸鼠尾静脉内。
- 3) 测量、记录瘤体数据：裸鼠由第四军医大学动物实验中心饲养，期间密切观察裸鼠体重和健康状态；约 4 周后处死裸鼠，剥离肝脏组织，计数肝脏表面转移结节数；石蜡包埋，切片。

## 3 结果

### 3.1 构建 miR-7 功能获得和功能缺失细胞模型

使用 miR-7 模拟物 (miR-7 mimic) 和抑制物 (miR-7 inhibitor) 分别瞬时转染胃癌细胞系 BGC823、SGC7901、GC9811 和 GC9811-P 后。利用实时定量 PCR 方法检测 miR-7 在各胃癌细胞系中的表达情况。结果表明：与阴性对照相比，转染 miR-7 mimic 后 BGC823、SGC7901 和 GC9811-P 中 miR-7 的表达水平显著升高 (图 2-1A)；转染 miR-7 inhibitor 后，BGC823、SGC7901 和 GC9811 中 miR-7 的表达水平明显降低 (图 2-1B)。

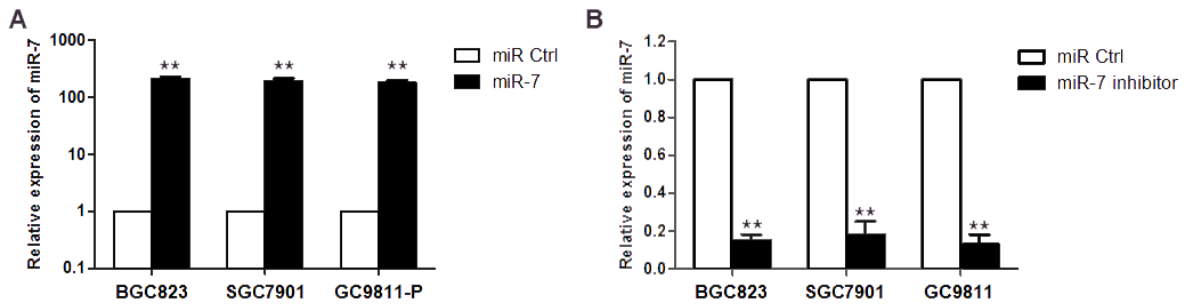


图 2-1 miR-7 mimic 和 inhibitor 转染胃癌细胞后 miR-7 的表达

**A:** miR-7 mimic 转染胃癌细胞后 miR-7 的表达；**B:** miR-7 inhibitor 转染胃癌细胞后 miR-7 的表达。

分别使用慢病毒包装的 miR-7 过表达载体感染 BGC823、SGC7901 和 GC9811-P 细胞，miR-7 shRNA 干扰载体感染 BGC823 和 SGC7901 细胞，抗性筛选 4 周后获得稳定感染细胞系。利用实时定量 PCR 检测 miR-7 在各细胞系中的表达情况，结果表明：与阴性对照相比，感染 miR-7 过表达慢病毒后，BGC823 细胞中 miR-7 表达水平明显升高，感染 miR-7 shRNA 干扰慢病毒后，BGC823 细胞中 miR-7 表达水平明显降低（图 2-2B）。

上述结果表明，通过瞬时转染和稳定感染，在胃癌细胞中有效地上调和下调了 miR-7，成功构建了 miR-7 的功能获得和功能缺失细胞模型。

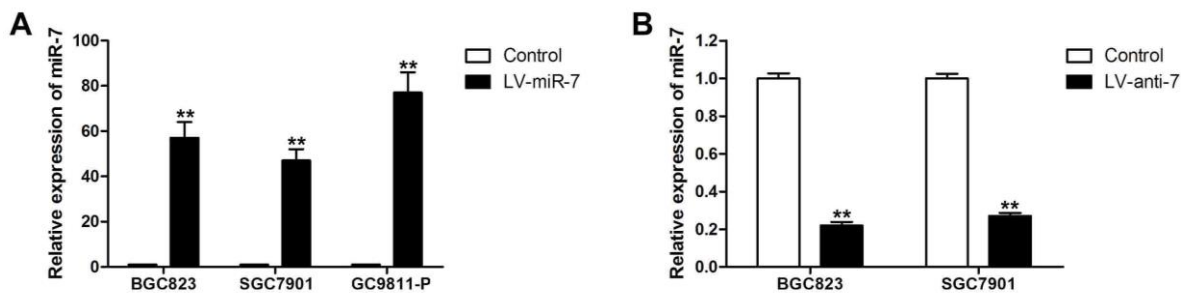


图 2-2 miR-7 过表达和 shRNA 干扰慢病毒感染胃癌细胞后 miR-7 的表达

**A:** miR-7 过表达慢病毒感染胃癌细胞后 miR-7 的表达；**B:** miR-7 shRNA 慢病毒感染胃癌细胞后 miR-7 的表达。

### 3.2 miR-7 抑制胃癌细胞体外增殖、促进凋亡和逆转耐药

利用 MTT 法检测 miR-7 对胃癌细胞体外增殖活性的影响并绘制生长曲线，结果表明：上调 miR-7 后 BGC823 和 SGC7901 细胞的存活率低于对照组；下调 miR-7 后

BGC823 和 SGC7901 细胞的存活率则高于对照组（图 2-3A）。利用流式细胞术检测 miR-7 对胃癌细胞周期分布的影响，结果表明：上调 miR-7 后 BGC823 和 SGC7901 细胞在 G1 期的分布较对照组增多，S 期的分布较对照组减少；下调 miR-7 后 BGC823 和 SGC7901 细胞在 G1 期的分布则较对照组减少，S 期的分布则较对照组增多（图 2-3A）。进一步通过平板集落形成实验和软琼脂集落形成实验表明：上调 miR-7 后 BGC823 细胞的集落形成数明显少于对照组；下调 miR-7 后 BGC823 细胞的集落形成数则多于对照组（图 2-3B）。上述结果表明，miR-7 能在体外抑制胃癌细胞的生长和增殖。

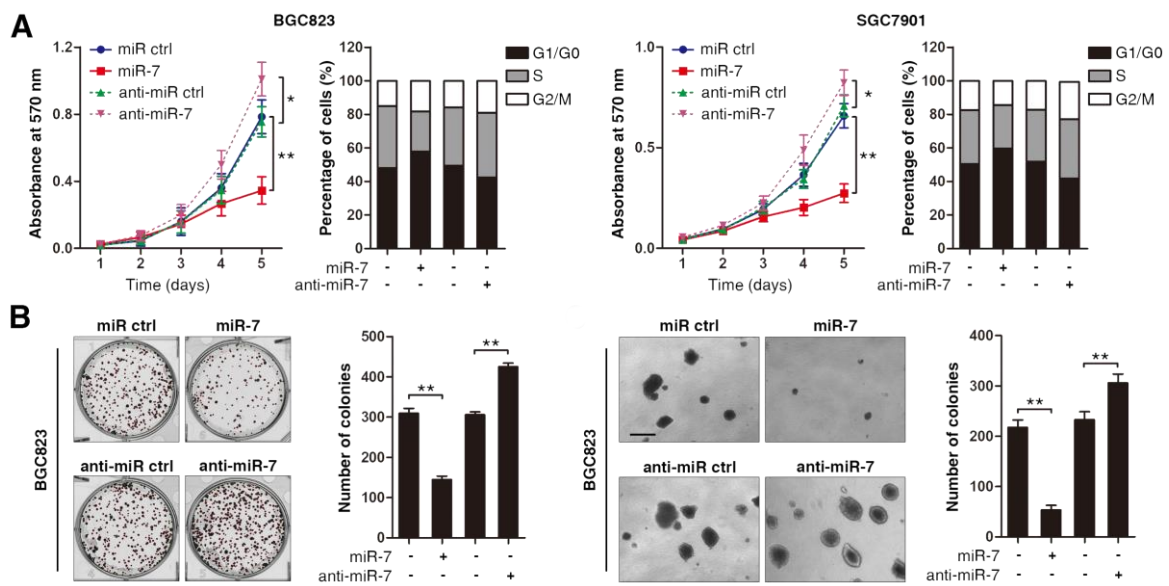


图 2-3 miR-7 对胃癌细胞增殖能力的影响

**A:** miR-7 对 BGC823（左）和 SGC7901（右）细胞体外增殖活性和周期分布的影响；  
**B:** miR-7 对 BGC823 细胞的集落形成能力（左）和非锚定生长能力（右）的影响。

利用流式细胞术检测 miR-7 对胃癌细胞凋亡的影响，结果表明：上调 miR-7 后 BGC823 和 SGC7901 细胞的凋亡率明显高于对照组；下调 miR-7 后 BGC823 和 SGC7901 细胞的凋亡率则低于对照组（图 2-4A）。进一步利用流式细胞术检测 miR-7 联合顺铂（CDDP）或 5-氟尿嘧啶（5-FU）对胃癌耐药细胞凋亡的影响，结果表明：上调 miR-7 联合 CDDP 或 5-FU 后胃癌多药耐药细胞系 SGC7901/VCR 中凋亡率显著高于对照组；下调 miR-7 联合 CDDP 或 5-FU 后胃癌多药耐药细胞系 SGC7901/VCR 中凋亡率则低于对照组（图 2-4B）。上述结果表明，miR-7 能在体外促进胃癌耐药细胞凋亡。



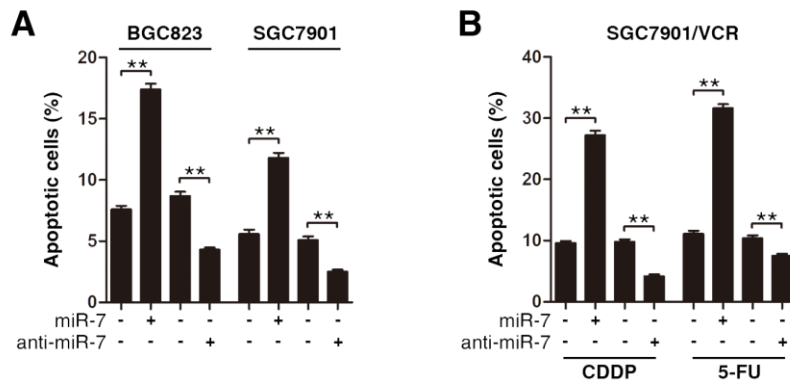


图 2-4 miR-7 对胃癌细胞凋亡的影响

**A:** miR-7 对 BGC823 和 SGC7901 细胞凋亡的影响；**B:** miR-7 联合顺铂（CDDP）或 5-氟尿嘧啶（5-FU）对胃癌多药耐药细胞 SGC7901/VCR 凋亡的影响。

### 3.3 miR-7 抑制胃癌细胞迁移和侵袭

利用 Transwell 迁移和侵袭实验检测 miR-7 对胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响，结果表明：上调 miR-7 后 GC9811-P 细胞的迁移和侵袭能力显著降低；下调 miR-7 后 GC9811 细胞的迁移和侵袭能力则明显增强（图 2-5）。上述实验表明，miR-7 能在体外抑制胃癌细胞迁移和侵袭。

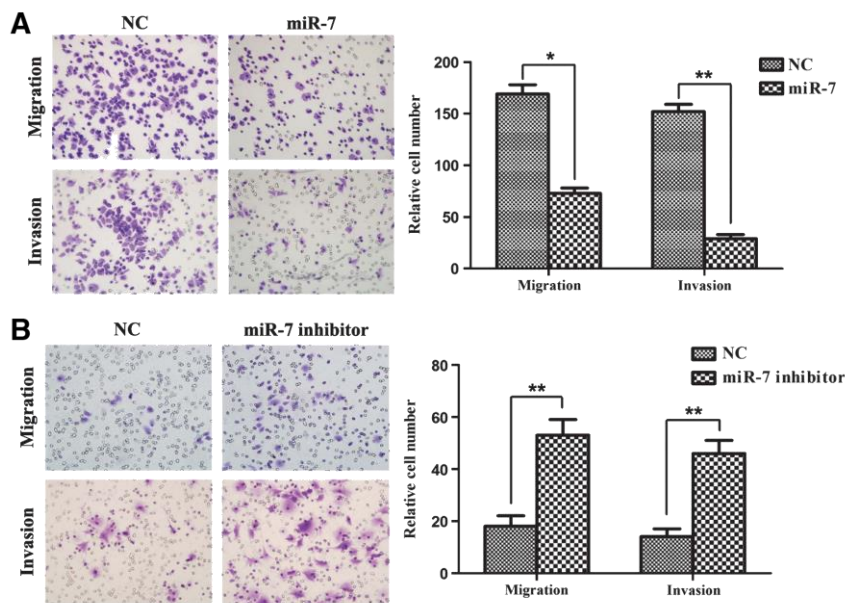


图 2-5 miR-7 对胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响

**A:** 过表达 miR-7 对 GC9811-P 细胞迁移和侵袭能力的影响；**B:** 抑制 miR-7 对 GC9811 细胞迁移和侵袭能力的影响。

### 3.4 miR-7 抑制胃癌细胞体内生长和转移

利用裸鼠移植瘤模型观察 miR-7 对胃癌细胞体内生长过程的影响，结果表明：稳定上调 miR-7 的 BGC823 细胞形成的瘤体生长速度、瘤体体积和重量均小于对照组；稳定下调 miR-7 的 BGC823 细胞形成的瘤体生长速度、瘤体体积和重量则均大于对照组（图 2-6）。

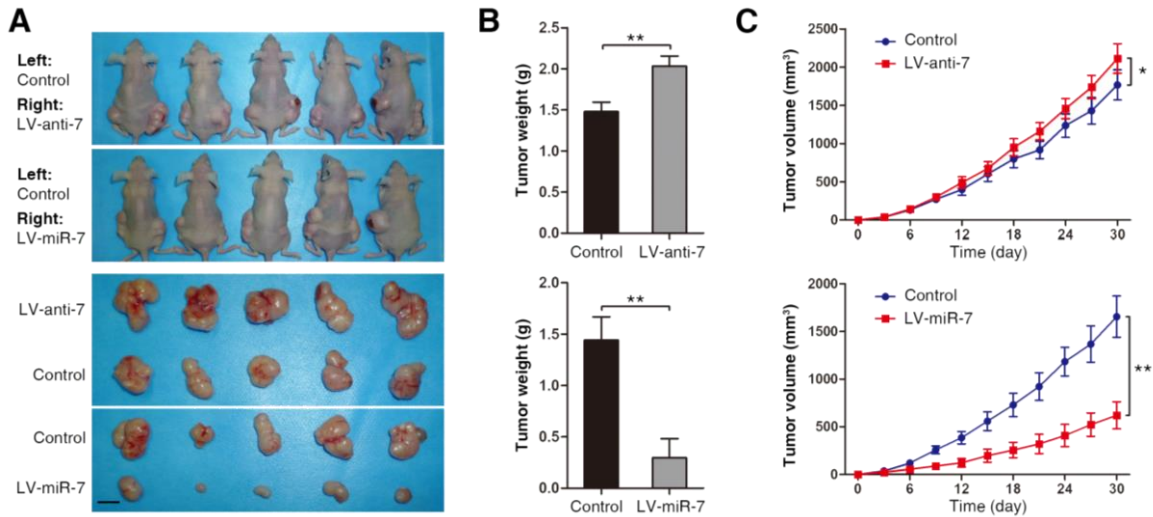


图 2-6 miR-7 对胃癌细胞体内生长能力的影响

**A:** miR-7 对 BGC823 细胞移植瘤瘤体体积的影响；**B:** miR-7 对 BGC823 细胞移植瘤瘤体重量的影响；**C:** miR-7 对 BGC823 细胞移植瘤生长速率的影响。

利用裸鼠转移瘤实验观察 miR-7 对胃癌细胞体内转移过程的影响，结果表明：稳定感染 miR-7 的 GC9811-P 细胞在肝脏形成的转移结节的数量明显少于对照组（图 2-7）。上述实验表明，miR-7 能抑制胃癌细胞体内的生长和转移过程。

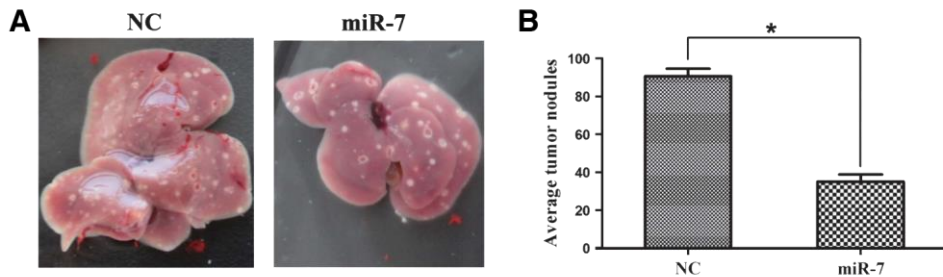


图 2-7 miR-7 对胃癌细胞体内转移能力的影响

**A:** 感染 miR-7（右）和对照（左）的 GC9811-P 细胞在裸鼠肝脏形成的转移结节；  
**B:** miR-7 对 GC9811-P 细胞在裸鼠肝脏形成转移结节数量的影响。

## 4 讨论

肿瘤相关 miRNA 根据其在调控肿瘤恶性生物学行为方面所发挥的功能,可大致划分为两类:促癌 miRNA (oncogenic miRNAs, oncomiRs) 和抑癌 miRNA (tumor suppressor miRNA, TSmiRs) [49]。据文献报道,在多数恶性肿瘤类型中,miR-7 发挥了抑癌 miRNA 的作用。在调控肿瘤细胞增殖和凋亡表型方面:Kefas 等在胶质瘤细胞系 U87MG、T98G、GBM6 和 TSC-0308 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞生长速率,并出现细胞周期阻滞,S 期细胞减少,亚 G0 期细胞增多<sup>[81]</sup>;Reddy 等在乳腺癌细胞系 MDA-MB231 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞的非贴附性生长能力和裸鼠体内成瘤能力<sup>[82]</sup>;Webster 等在肺癌细胞系 A549 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞生长速率和生存能力,但未见对细胞凋亡有显著影响<sup>[93]</sup>,Rai 等在肺癌细胞系 PC-9、H3255、H1975 和 A549 中观察到 miR-7 能显著抑制细胞的体内外生长,并诱导细胞凋亡<sup>[94]</sup>,Xiong 等亦在 A549 和 H1299 细胞中观察到 miR-7 能显著抑制细胞体内外生长,并诱导细胞凋亡<sup>[84]</sup>;Jiang 等在舌鳞状细胞癌细胞系 UM1 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞增殖,并诱导 G0/G1 周期阻滞和细胞凋亡<sup>[83]</sup>;Saydam 等在神经鞘瘤细胞系 HEI-193 中观察到转染 miR-7 能显著抑制细胞生长,诱导细胞凋亡,并抑制肿瘤细胞的体内生长能力<sup>[95]</sup>;Kalinowski 等在头颈癌细胞系 HN5 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞的体内外生长<sup>[96]</sup>;Fang 等在肝癌细胞系 QGY-7703 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞体内外生长,并诱导细胞周期停滞,但未见细胞凋亡增加<sup>[85]</sup>;Zhang 等亦在肝癌细胞系 HepG2、SMMC-7721 和 BEL-7404 中观察到转染 miR-7 能诱导细胞周期停滞<sup>[97]</sup>;Liu 等在宫颈癌细胞系 Hela 和 C-33A 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞体外生长和集落形成能力<sup>[87]</sup>;Zhang 等在结肠癌细胞系 HCT116 和 LOVO 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞体外生长和集落形成能力,并诱导细胞周期阻滞和细胞早期凋亡<sup>[88]</sup>。在调控肿瘤细胞侵袭转移表型方面:Reddy 等在乳腺癌细胞系 MDA-MB231 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞的运动和侵袭能力<sup>[82]</sup>;Wu 等在胶质瘤细胞系 U87 和 U251 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞的侵袭和迁移能力<sup>[98]</sup>;Fang 等在肝癌细胞系 QGY-7703 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞的侵袭和迁移能力,并抑制细胞在裸鼠肝和肺中形成转移灶的能力<sup>[85]</sup>;Kong 等在乳腺癌细胞系 MDA-MB-435s 和 MDA-MB-231 细胞中观察到转染 miR-7 能抑制细胞的迁移和侵袭能力,并抑制细胞

在裸鼠肺中形成转移灶的能力<sup>[99]</sup>；Giles 等在黑色素瘤细胞系 A2058、WM266-4 和 A375 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞的迁移和侵袭能力<sup>[86]</sup>；Okuda 等在乳腺癌细胞系 MDA-MB231、231BoM 和 231BrM 的 CD24<sup>-</sup>、CD44<sup>+</sup>、ESA<sup>+</sup>细胞亚群中观察到转染 miR-7 能抑制细胞体外的侵袭能力，并抑制细胞在裸鼠脑组织中形成转移灶的能力<sup>[100]</sup>；Wang 等在胶质瘤细胞系 U251 和 U-118MG 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞体外的侵袭能力，并抑制细胞在裸鼠肺中形成转移灶的能力<sup>[101]</sup>。在调控肿瘤细胞耐药表型方面：Pogribny 等在乳腺癌 CDDP 耐药细胞系 MCF-7/CDDP 中观察到转染 miR-7 能增加细胞对 CDDP 的药物敏感性<sup>[102]</sup>；Kalinowski 等在头颈癌细胞系 FaDu 和 SCC-25 中观察到转染 miR-7 能增强细胞对埃罗替尼（erlotinib）的敏感性<sup>[96]</sup>。

上述研究表明，miR-7 在多数恶性肿瘤中发挥了抑制肿瘤生长和转移的作用。然而，也有少数研究指出 miR-7 在某些肿瘤中扮演了促癌 miRNA 的角色：Foekens、Veerla 和 Rao 等分别在乳腺癌、膀胱癌和宫颈癌标本中发现 miR-7 表达水平与患者不良预后呈正相关<sup>[103-105]</sup>；Cheng 等在肺癌细胞系 A549 中观察到下调 miR-7 能抑制细胞增殖并诱导凋亡<sup>[106]</sup>；Chou 等在肺癌细胞系 CL-1 中观察到 miR-7 能促进细胞生长和肿瘤形成<sup>[89]</sup>。可见，miR-7 在肿瘤中所发挥的作用并非一成不变，可能随着肿瘤组织类型或发展阶段的不同而改变。在本课题开展前，尚未见有对 miR-7 在胃癌中的功能研究，因此，明确 miR-7 在胃癌各表型中所发挥的作用，鉴别其在胃癌中是促癌 miRNA 还是抑癌 miRNA，是评估其在胃癌中的潜在治疗价值的关键。

在本部分的研究中，为系统研究 miR-7 对胃癌细胞增殖、凋亡、耐药和侵袭转移表型的影响，我们选择了两株中低分化胃癌细胞系 BGC823 和 SGC7901，以及本实验室前期建立的一对胃癌高低转移潜能细胞系 GC9811 和 GC9811-P，通过在细胞中瞬时转染 miR-7 的模拟物或抑制物，或通过建立稳定表达 miR-7 表达载体和 RNA 干扰载体的功能获得或功能缺失模型，分别在体内外上调和下调 miR-7 的表达。通过体内外功能研究，我们的结果表明，上调 miR-7 能够抑制胃癌细胞增殖，促进胃癌细胞早期凋亡，逆转胃癌细胞的耐药性，并抑制胃癌细胞在裸鼠体内生长和转移；而下调 miR-7 则可促进胃癌细胞增殖，抑制胃癌细胞凋亡，降低胃癌细胞对化疗药物的敏感性，并加速胃癌细胞在裸鼠体内生长。我们的结果充分说明，miR-7 对胃癌恶性生物学表型具有抑制作用。同期，Kong 等报道在胃癌细胞系 AZ-521 和 Kato-III 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞的增殖和软琼脂集落形成能力<sup>[99]</sup>；Xie 等也在胃癌

细胞系 BGC-803 中观察到转染 miR-7 能抑制细胞的存活、运动和迁移能力<sup>[107]</sup>。以上报道与我们的研究结论相一致,共同表明了 miR-7 在胃癌中发挥着抑癌 miRNA 的功能。值得注意的是,由于肿瘤相关 miRNA 的主要作用机制是通过抑制其下游靶分子(通常是癌基因或抑癌基因)介导其功能,因此,要最终解决 miR-7 在某种肿瘤类型中是促癌 miRNA 还是抑癌 miRNA 的疑问,除通过进行功能实验来验证之外,还需要寻找 miR-7 的关键靶分子,以阐明其发挥功能的分子生物学机制。

## 第三部分 miR-7 靶分子的高通量筛选与鉴定

本文前两部分已证实 miR-7 在胃癌中表达降低，过表达 miR-7 能够抑制胃癌细胞体外和体内的生长与转移过程，提示其在胃癌的发生和发展过程中发挥抑癌作用。由于 miRNA 主要通过抑制其下游的靶分子来发挥作用，因此，确定 miR-7 在胃癌细胞中的靶分子是揭示其作用机制的关键环节。本部分实验采用 cDNA 基因芯片和蛋白组学 iTRAQ 技术，在全基因组的 mRNA 和蛋白表达两个层次高通量筛选 miR-7 的候选靶分子，随后利用生物信息学和分子生物学方法从候选靶分子中鉴定出了 miR-7 的多个直接作用靶分子。

### 1 材料

#### 1.1 细胞系

GES 细胞、BGC823 细胞、SGC7901 细胞、GC9811 细胞和 GC9811-P 细胞来源同第一部分 1.1。

#### 1.2 载体

双萤光素酶报告基因载体采用 psi-CHECK-2 质粒。

#### 1.3 基因芯片

Agilent 人全基因 4×44K 芯片 (design ID: 014850) 由上海伯豪生物技术有限公司代理。

#### 1.4 主要试剂

细胞培养基	Hyclone 公司
胎牛血清	Hyclone 公司
胰蛋白酶	Hyclone 公司
miRNeasy Mini Kit	Qiagen 公司
RIPA 裂解液	碧云天公司



Complete Cocktail 蛋白酶抑制剂	Roche 公司
PhosSTOP 磷酸酶抑制剂	Roche 公司
iTRAQ 标记试剂盒	Thermo 公司
Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒	Promeg 公司
Dual-Luciferase Reporter Assay System (E1910)	Promega 公司
Gene Expression Hybridization Kit	Agilent 公司
RELA 抗体	Cell Signaling 公司
FOS 抗体	Cell Signaling 公司
IGF1R 抗体	Abcam 公司
ECL 显影液	Thermo 公司

## 1.5 主要仪器

CO <sub>2</sub> 细胞培养箱	Thermo 公司
超净工作台	Thermo 公司
超低温冰箱	Thermo 公司
光学显微镜	Olympus 公司
台式高速离心机	Eppendorf 公司
纯水仪	Millipore 公司
蛋白质谱仪	Thermo 公司
芯片杂交仪	Agilent 公司
普通 PCR 仪	AB 公司
实时定量 PCR 仪	AB 公司
快速转膜仪	Bio-Rad 公司
ChemiDox XRS 凝胶成像系统	Bio-Rad 公司

## 2 方法

### 2.1 瞬时转染构建 miR-7 过表达模型

方法同第二部分 2.1.1。

## 2.1 iTRAQ 技术高通量筛选 miR-7 过表达后的差异表达蛋白

### 2.2.1 胃癌细胞蛋白的提取与定量

- 1) 裂解细胞：将转染 miR-7 mimic 和阴性对照 48 hr 后的 BGC823 细胞接种于直径 10 cm 的培养皿；当细胞融合至 90% 时，移除培养液，用预冷至 4℃ 的 PBS 漂洗 3 次；使用细胞刮刀将贴壁细胞转移至预冷的 1.5 ml EP 管中，离心 5 min (4℃, 1000×g)；移除上清后，加入约 200 μl 细胞裂解液（含 Cocktail 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂），置于冰上裂解 20 min 后，离心 5 min (4℃, 12000×g)，上清即为蛋白裂解液，取 20 μl 进行蛋白定量，剩余部分于 -80℃ 保存。
- 2) 蛋白定量：用 Bradford 法进行蛋白定量；根据样本蛋白浓度调整至每组样品蛋白含量约为 40 μg，体积 20 μl。

### 2.2.2 蛋白酶解

按照 iTRAQ 试剂盒的标准操作步骤，对各组蛋白依次进行氨基酸残基变性、还原和封闭，胰蛋白酶 37℃ 孵育 16 hr，真空离心干燥。

### 2.2.3 iTRAQ 标记

取各组蛋白样品，加入 30 μl Dissolution 溶液；混和均匀后，加入 iTRAQ 标记试剂（标记试剂 113、114、115 和 116 分别对应 4 个样本），室温孵育 1 hr；混合 4 组样本；真空离心干燥。

### 2.2.4 肽段分离及质谱鉴定

- 1) 肽段分离：依次通过第一维强阳离子柱分离、脱盐纯化样品、第二维反向液相色谱分离样品及自动点靶等步骤，将样品准备上样。
- 2) 质谱鉴定：使用 Q-Exactive 蛋白质分析仪进行 iTRAQ 检测；利用 Proteome Discoverer software 软件包 (V1.4) 在 UniProt human canonical sequence protein database 中检索目的蛋白并定量分析。

## 2.2 cDNA 基因芯片高通量筛选 miR-7 过表达后的差异表达基因

### 2.3.1 胃癌细胞总 RNA 的提取与定量

方法同第一部分 2.2。

### 2.3.2 基因芯片检测人全基因组基因表达

- 1) 样品 RNA 的放大和标记：采用 Agilent 表达谱芯片配套试剂盒和标准操作流程对



样品总 RNA 中的 mRNA 进行放大和标记；使用 RNeasy mini kit 纯化标记后的 cRNA。

- 2) 芯片杂交：杂交 cRNA 上样量为 1.65  $\mu\text{g}$ ，并在洗缸中使用 Gene Expression Wash Buffer Kit 洗片；按照 Agilent 表达谱芯片配套提供的杂交标准流程和配套试剂盒在滚动杂交炉中滚动杂交 17 hr (65 $^{\circ}\text{C}$ ，10 rpm)。
- 3) 芯片扫描：完成杂交的芯片采用 Agilent Microarray Scanner 进行扫描；使用 Feature Extraction software (V10.7) 读取数据，最后采用 Gene Spring Software (V11.0) 的 Quantile 算法进行归一化处理。

## 2.4 iTRAQ 与基因芯片高通量筛选结果的数据分析

将两次 iTRAQ 结果中  $P$  值  $< 0.05$ ，且差异倍数  $> 1.2$  倍或  $< 0.8$  倍的蛋白筛选出来，取两者交集，两次重复出现蛋白的差异倍数取其算数平均值；将两次基因芯片结果中  $P$  值  $< 0.05$ ，且差异倍数  $> 2$  倍或  $< 0.5$  倍的基因筛选出来，取两者交集，两次重复出现基因的差异倍数取其算数平均值。

## 2.5 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-7 对靶分子的结合

### 2.5.1 构建 RELA、FOS 和 IGF1R 的野生型报告基因载体

- 1) 合成引物：确定 RELA、FOS 和 IGF1R 的 miR-7 结合位点核苷酸序列；设计野生型和突变型 miR-7 结合位点的正反引物并扩增引物序列。
- 2) 制备基因组模板：胰蛋白酶消化、收集细胞至 EP 管中，加入 600  $\mu\text{l}$  核裂解液，用移液枪抽吸数次以促进裂解，65 $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min；加入 3  $\mu\text{l}$  RNA 酶，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min，冷却至室温；加入 200  $\mu\text{l}$  蛋白沉淀液，涡旋振荡器振荡 20 sec，冰上冷却 5 min；离心 5 min (室温，12000 $\times g$ ) 形成白色致密的蛋白沉淀；移取上清 (含 DNA) 至一清洁 EP 管中，加入 600  $\mu\text{l}$  异丙醇；轻轻上下颠倒混匀溶液，直至 DNA 形成块状沉淀；离心 5 min (室温，12000 $\times g$ ) 形成白色 DNA 沉淀；移除上清，加入 600  $\mu\text{l}$  70%乙醇，轻轻颠倒数次以清洗 DNA 沉淀；离心 2 min (室温，12000 $\times g$ )；移除上清，清洁空气干燥 15 min；加入 100  $\mu\text{l}$  去离子水，60 $^{\circ}\text{C}$  恒温箱孵育 1 hr 以溶解 DNA 后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。
- 3) PCR 钓取基因：按照以下剂量配制 PCR 反应液：

Component	Volume
2 mM dNTP mixture	2.5 $\mu$ l
10 $\times$ KOD buffer	2.5 $\mu$ l
25 mM MgSO <sub>4</sub>	1.5 $\mu$ l
DNA 模板	0.5 $\mu$ l
Forward 引物	0.3 $\mu$ l
Reverse 引物	0.3 $\mu$ l
KOD Plus Neo	0.3 $\mu$ l
Nuclease free water	17.1 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ l

PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 98 $^{\circ}$ C, 30 sec, 58 $^{\circ}$ C, 30 sec, 68 $^{\circ}$ C, 30 sec; 32 个反应循环。

- 4) 载体双酶切: 分别取 RELA、FOS 和 IGF1R 的 PCR 产物与 psiCHECK-2 载体各 15  $\mu$ l, 用 XhoI 与 NotI 双酶切, 酶切体系如下:

Component	Volume
PCR 模板	15 $\mu$ l
XhoI	1.5 $\mu$ l
NotI	1.5 $\mu$ l
10 $\times$ buffer	5 $\mu$ l
Nuclease free water	27 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

- 5) 目的片段与载体连接: 反应体系如下, 16 $^{\circ}$ C 反应 2 hr。

Component	Volume
酶切回收的 PCR 产物	3 $\mu$ l
酶切回收的载体	2 $\mu$ l
10 $\times$ Ligase Buffer	1 $\mu$ l
T4 DNA Ligase	1 $\mu$ l
Nuclease free water	3 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

- 6) 连接产物的转化: 将 5  $\mu\text{l}$  连接产物加入 50  $\mu\text{l}$  DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 轻轻旋转混匀, 冰上孵育 30 min; 42 $^{\circ}\text{C}$  水浴热休克 90 sec; 快速移至冰浴中孵育 2 min; 加入 200  $\mu\text{l}$  LB 培养基, 混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养箱中 1 hr; 将菌液均匀涂布于含 100  $\mu\text{g/ml}$  氨苄青霉素的 LB 平板上; 倒置平板, 转移入 37 $^{\circ}\text{C}$  生化培养箱培养 16 hr。
- 7) 质粒酶切鉴定阳性克隆: 挑选阳性克隆, 送检测序。

### 2.5.2 共转染 miR-7 和萤光素酶报告基因载体

除转染试剂使用 Lipofectamine 2000 外, 其余方法同第二部分 2.1.2。

### 2.5.2 检测 miR-7 对各报告基因载体萤光素酶活性的影响

- 1) 裂解细胞: 共转染 48 hr 后, 移除培养基, PBS 漂洗 3 次; 在 96 孔板中每孔样本加入 20  $\mu\text{l}$  PLB 裂解液, 室温震荡 15 min。
- 2) 检测萤光值: 在 Luminometer 萤光发光仪的自动进样器 1 和 2 中分别加入 LAR II 和 Stop&Glo 试剂; 设置程序预读 2 sec, 读值 10 sec, LAR II 和 Stop&Glo 试剂分每次进样量为 100  $\mu\text{l}$ ; 运行程序, 读取萤光值, 保存数据。

## 2.6 实时定量 PCR 检测细胞中 RELA、FOS 和 IGF1R 的表达

方法同第一部分 2.2。

## 2.7 Western blot 检测细胞中 RELA、FOS 和 IGF1R 的表达

### 2.7.1 胃癌细胞蛋白的提取与定量

方法同本部分 2.2.1。

### 2.7.2 Western blot 检测细胞蛋白表达

- 1) 电泳: 按照目的蛋白分子量制备不同浓度的分离胶和积层胶; 在蛋白样品中加入相应体积的浓缩 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$  加热 5 min; 待蛋白样本冷却至室温后, 上样至 SDS-PAGE 胶的加样孔内; 使用 Bio-Rad 的标准电泳装置进行电泳, 在积层胶时使用低电压恒压电泳 (约 80 V), 而在溴酚蓝进入分离胶时使用高电压恒压电泳 (约 120 V), 当溴酚蓝到达分离胶底端处附近时停止电泳。
- 2) 转膜: 将滤纸、硝酸纤维素膜裁切至凝胶大小, 置于转膜缓冲液中浸透; 按滤纸、凝胶、硝酸纤维素膜、滤纸的顺序, 由下至上组装转膜夹子; 使用 Bio-Rad Trans-Blot Turbo 快速转膜仪转膜, 设置参数: 恒压 25 V, 时间 14 min。

- 3) 封闭：将硝酸纤维素膜浸于 5% 脱脂牛奶（TBS-T 配置）中，封闭膜上非特异结合位点 30 min。
- 4) 一抗孵育：移除封闭液；按照适当比稀释一抗，置于 4℃ 缓慢摇动孵育过夜。
- 5) 二抗孵育：移除一抗孵育液，PBS 洗涤 5 min，重复洗涤 3 次；按照适当比稀释二抗，置于室温缓慢摇动孵育 2 hr。
- 6) 蛋白检测：使用 ECL 化学发光液，在 Bio-Rad ChemiDox XRS 凝胶成像系统中显影；使用 Quantity One 软件包（V4.62）测定各蛋白条带的灰度值。

### 3 结果

#### 3.1 联合转录组学、蛋白质组学和生物信息学方法筛选 miR-7 的靶分子

使用 miR-7 mimic 及其阴性对照瞬时转染 BGC823 细胞，利用蛋白组学 iTRAQ 技术，高通量筛选过表达 miR-7 的 BGC823 细胞与对照细胞中差异表达的蛋白（图 3-1A）。经两次重复生物学重复，两次结果共同鉴定出差异表达蛋白 133 个，其中上调蛋白 58 个，下调蛋白 75 个（图 3-1B，附表 1-2）。利用基因芯片，高通量筛选过表达 miR-7 的 BGC823 细胞与对照细胞中差异表达的基因。经两次重复生物学重复，共同鉴定出差异表达分子 331 个，其中上调分子 151 个，下调蛋白 180 个（图 3-1B，附表 3-4）。

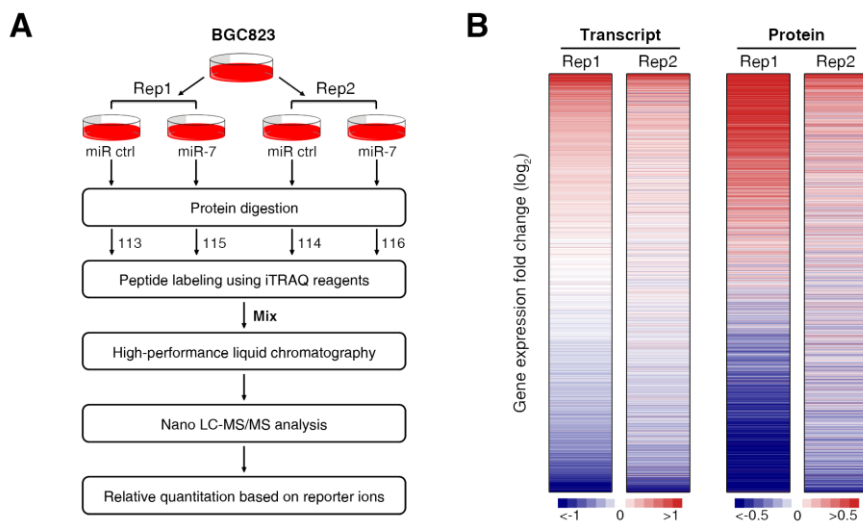


图 3-1 联合基因芯片和 iTRAQ 技术筛选 miR-7 靶分子

**A:** 蛋白组学 iTRAQ 技术筛选 miR-7 靶分子流程示意图；**B:** 基因芯片和 iTRAQ 技术检测 miR-7 过表达后的差异表达基因热图。

### 3.2 RELA、FOS 和 IGF1R 是 miR-7 的直接靶分子

在基因芯片和 iTRAQ 所筛选出的差异表达基因中，RELA 的 3'-UTR 区域存在 miR-7 的 2 个结合位点，FOS 和 IGF1R 的 3'-UTR 区域均存在 miR-7 的 3 个结合位点。根据以上分析，分别构建包含 RELA、FOS 和 IGF1R 的野生型和突变型 3'-UTR 的荧光素酶报告基因载体(图 3-2)。

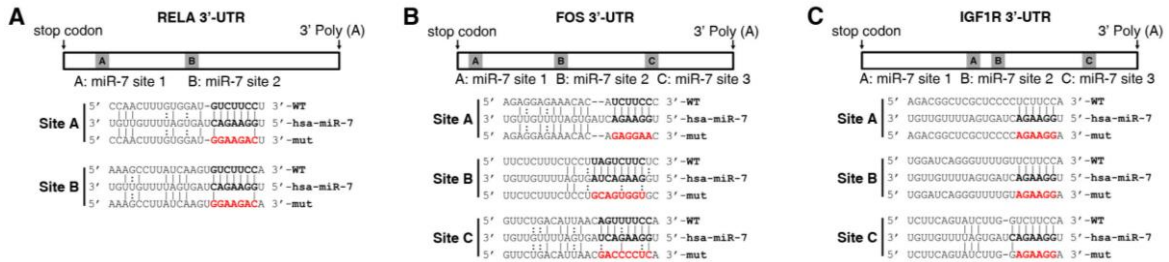


图 3-2 RELA、FOS 和 IGF1R 3'-UTR 区 miR-7 结合及突变位点示意图

**A:** RELA 3'-UTR 区 miR-7 结合及突变位点示意图; **B:** FOS 3'-UTR 区 miR-7 结合及突变位点示意图; **C:** IGF1R 3'-UTR 区 miR-7 结合及突变位点示意图。

利用双荧光素酶报告基因实验，检测 miR-7 是否通过结合 3'-UTR 上的结合位点负向调控 RELA、FOS 和 IGF1R 的表达。结果显示，上调 miR-7 可抑制含有其结合位点的 RELA 野生型 3'-UTR 报告基因的荧光强度，而对于突变结合位点 A 和同时突变结合位点 A 与 B 的突变型质粒的荧光强度则无明显影响(图 3-3A); 上调 miR-7 可抑制含有其结合位点的 FOS 野生型 3'-UTR 报告基因的荧光强度，而对于同时突变结合位点 A、B 和 C 的突变型质粒的荧光强度则无明显影响(图 3-3B); 上调 miR-7 可抑制含有其结合位点的 IGF1R 野生型 3'-UTR 报告基因的荧光强度，而对于突变结合位点 A 和 B 的突变型质粒的荧光强度则无明显影响(图 3-3C)。

上述实验表明，miR-7 能通过与 RELA、FOS 和 IGF1R 的 3'-UTR 区域上的结合位点直接结合，RELA、FOS 和 IGF1R 是 miR-7 的直接靶分子。

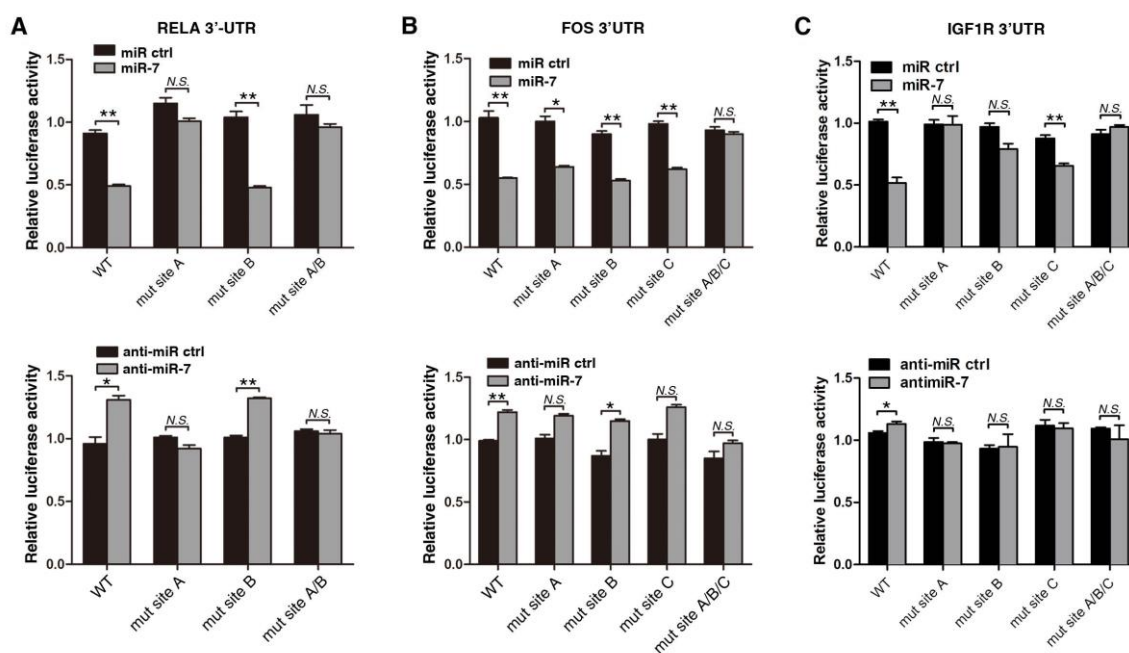


图 3-3 miR-7 对 RELA、FOS 和 IGF1R 基因 3'-UTR 的直接调控

**A:** 双萤光素酶报告基因实验检测 miR-7 对 RELA 3'-UTR 的直接调控；**B:** 双萤光素酶报告基因实验检测 miR-7 对 FOS 3'-UTR 的直接调控；**C:** 双萤光素酶报告基因实验检测 miR-7 对 IGF1R 3'-UTR 的直接调控。

### 3.3 miR-7 负性调控 RELA、FOS 和 IGF1R 的表达

使用 miR-7 mimic 和 miR-7 inhibitor 及其阴性对照，分别瞬时转染 BGC823、SGC7901、GC9811 和 GC9811-P 细胞。利用实时定量 PCR 检测 miR-7 对 RELA、FOS 和 IGF1R mRNA 表达水平的影响，结果表明：上调 miR-7 后 BGC823 和 SGC7901 细胞中 RELA 和 FOS 的 mRNA 均下降，下调 miR-7 后 BGC823 和 SGC7901 细胞中 RELA 和 FOS 的 mRNA 均上升（图 3-5A）；但在 GC9811-P 和 GC9811 细胞中，分别上、下调 miR-7 对 IGF1R 的 mRNA 表达均无明显影响（图 3-6A）。利用 Western blot 检测 miR-7 对 RELA、FOS 和 IGF1R 蛋白表达的影响，结果表明：上调 miR-7 后 BGC823 和 SGC7901 细胞中 RELA 和 FOS 的蛋白表达均下降，下调 miR-7 后 BGC823 和 SGC7901 细胞中 RELA 和 FOS 的蛋白表达均上升（图 3-5B）；在 GC9811-P 细胞中，上调 miR-7 后 IGF1R 的蛋白表达下降；在 GC9811 细胞中，下调 miR-7 后 IGF1R 的蛋白表达则上升（图 3-6B）。

上述实验表明，miR-7 能在转录和转录后两个水平负性调控 RELA 和 FOS 的表

达，但仅在转录后水平负性调控 IGF1R 的表达。

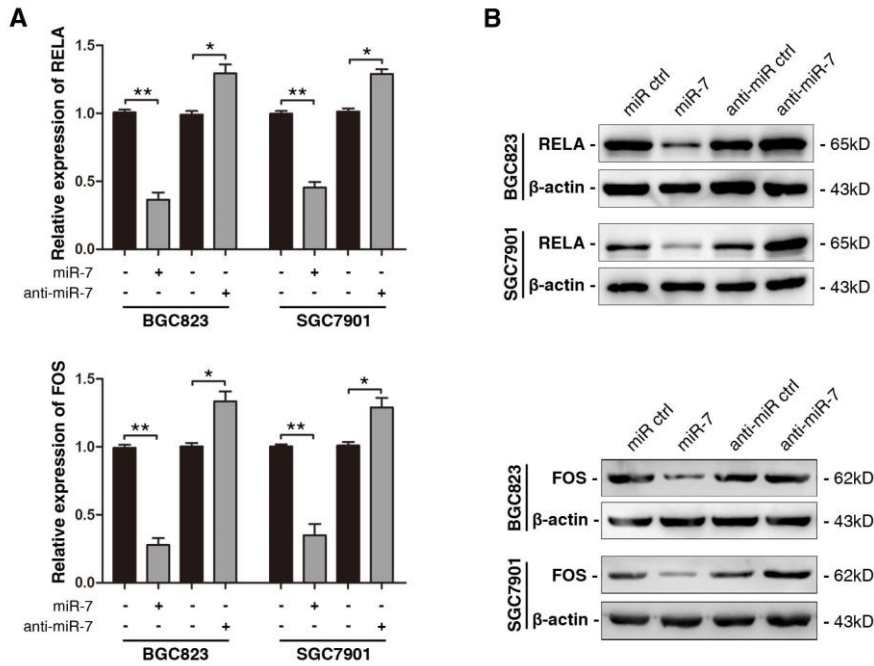


图 3-5 miR-7 对 RELA 和 FOS 基因表达的调控

**A:** miR-7 对 RELA 和 FOS mRNA 表达的调控; **B:** miR-7 对 RELA 和 FOS 蛋白表达的调控。

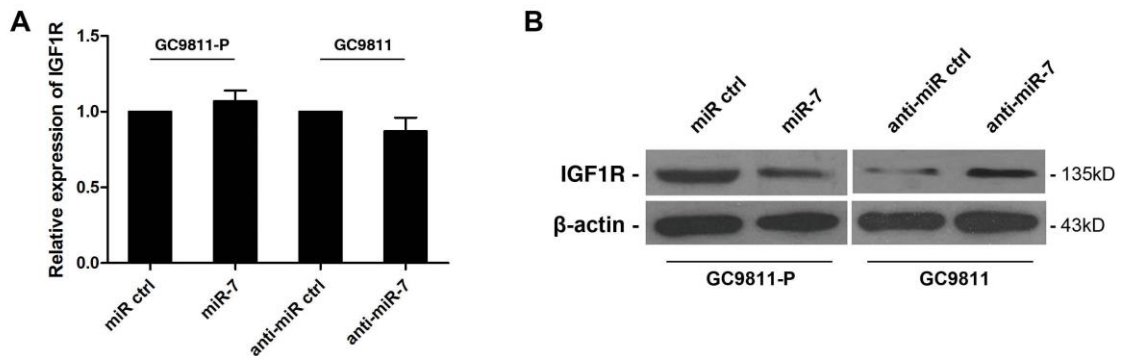


图 3-6 miR-7 对 IGF1R 基因表达的调控

**A:** miR-7 对 IGF1R mRNA 表达的调控; **B:** miR-7 对 IGF1R 蛋白表达的调控。

## 4 讨论

截至目前，miRBase 数据库收录 miRNA 的数量已超过 28000 条，但其中大多数 miRNA 的功能并不清楚，其原因在于这些 miRNA 所调控的靶分子尚不明确。由于 miRNA 与其靶分子结合具有不完全互补配对的特性，使得筛选和鉴定人类 miRNA



的靶分子具有相当的难度。在现阶段的研究实践中，筛选 miRNA 的靶分子一般有两种途径，一是通过计算机生物信息学软件预测，二是通过生物学实验方法筛选<sup>[108]</sup>。

生物信息学方法预测 miRNA 靶分子的主要原理是基于 miRNA 与靶分子间的相互作用规律，依据计算机算法对 miRNA 靶分子的样本群进行评分。目前，有多种 miRNA 靶分子预测软件可供使用，包括 miRanda<sup>[109]</sup>、TargetScan<sup>[110]</sup>和 PicTar<sup>[111]</sup>等，这些预测软件分别依据各自的算法对 miRNA 靶分子进行预测。虽然预测软件的算法各不相同，但都基于 miRNA 与靶分子间相互作用的基本原则，包括：（1）miRNA 与靶分子结合位点间的序列互补性；（2）miRNA 的结合位点在物种间的保守性；（3）miRNA-mRNA 杂合双链间的热稳定性；（4）靶分子 mRNA 折叠形成的二级结构形成等<sup>[108]</sup>。尽管各种预测软件的算法在不断增加和优化限制条件，由于目前已知的 miRNA 靶分子及其确切的靶点数量有限，因此在算法编写时缺乏足够的参考样本量，导致这些算法普遍存在特异性和灵敏度不可兼得的“先天不足”。此外，利用预测软件，一个 miRNA 常常可获得成百上千个候选靶分子，然而现阶段对计算机预测出来的靶分子缺乏快速的高通量鉴定方法，因此在很大程度上限制了预测结果的准确性，常导致较高的假阳性率<sup>[112]</sup>。虽然生物信息学方法有诸多不足，但由于利用软件预测 miRNA 靶分子简便易行，目前仍然是大多数 miRNA 的机制研究中所采用的方法。

生物学实验筛选 miRNA 靶分子的方法包括 miRNA 的单个靶分子鉴定技术和高通量多靶分子筛选技术。单个靶分子的鉴定主要是通过运用荧光素酶报告基因实验针对 miRNA 的靶分子进行逐一验证，结果准确率高，但效率较低，通常用作生物信息学预测后的结果验证。高通量靶分子筛选技术主要包括基因芯片筛选技术和蛋白质组学筛选技术。基因芯片筛选技术是在过表达或沉默 miRNA 后，利用基因芯片检测所有基因在 mRNA 水平的表达变化，以筛选 miRNA 的靶分子。Johnson 等在肺癌细胞系 A549 和肝癌细胞系 HepG2 中转染 let-7b 后，利用基因芯片检测到在 A549 细胞中 629 个基因发生变化（其中 244 个基因上调，385 个基因下调），在 HepG2 细胞中 1334 个基因发生变化（其中 636 个基因上调，698 个基因下调），两种细胞类型中共同筛选出 200 个表达变化的基因，并在其中鉴定出 NRAS 和 HMGA2 为 let-7b 的靶分子<sup>[113]</sup>。Frankel 等在乳腺癌细胞系 MCF-7 中转染 miR-21 抑制物后，利用基因芯片检测到细胞中 737 个基因发生变化（其中 402 个基因上调，335 个基因下调），并在其中鉴定出 PDCD4 为 miR-21 的靶分子<sup>[114]</sup>。随着生物芯片技术的发展，近年来利



用基因芯片高通量筛选 miRNA 靶分子的成本更为低廉, 数据分析也更为简便。然而, 这一技术也存在其缺陷: 第一, 该技术只能笼统地得出基因组中的差异表达分子, 无法区分 miRNA 的直接靶分子和间接靶分子; 第二, 由于某些 miRNA 可在不影响 mRNA 的情况下抑制蛋白表达, 所以该技术难以筛选出这一部分靶分子。蛋白质组学筛选技术是在过表达或沉默 miRNA 后, 利用蛋白质组学技术检测所有基因在蛋白水平的表达变化, 以筛选 miRNA 的靶分子。Leivonen 等在 MCF-7 细胞中转染 miR-193b 后, 利用 iTRAQ 技术检测到在细胞中 743 个蛋白表达发生变化 (其中 44 个蛋白显著上调, 39 个蛋白显著下调), 并在其中鉴定出 YWHAZ、SHMT2 和 AKR1C2 为 miR-193b 的靶分子<sup>[115]</sup>。Yang 等在 MCF-7 细胞中转染 miR-21 抑制物后, 利用 iTRAQ 技术检测到细胞中 1151 个蛋白表达发生变化 (其中 58 个蛋白显著上调, 13 个蛋白显著下调), 并在其中鉴定出 PDCD4、NCAPG、OXSR1 和 SEC23A 为 miR-21 的靶分子<sup>[116]</sup>。研究表明, 蛋白质组学筛选技术比基因芯片筛选技术更适于筛选功能性 miRNA 靶分子, 如蛋白质组学技术可筛选出某些仅抑制蛋白表达的 miRNA 的靶分子, 但现阶段定量蛋白质组学技术对细胞内低表达蛋白鉴别的准确性仍有待提高。值得指出的是, 这两种高通量方法均不能鉴别 miRNA 的直接靶分子和间接靶分子。

综上, 现阶段 miRNA 研究中所使用的靶分子筛选方法均存在各自的优缺点。在本部分的研究中, 我们联合运用基因芯片、蛋白质组学 iTRAQ 技术和生物信息学方法, 共同筛选 miR-7 在胃癌中的关键靶分子。这一策略的理论基础在于: 首先, 联合基因芯片和 iTRAQ 技术, 目的在于以 iTRAQ 技术弥补基因芯片筛选可能遗漏仅在蛋白水平受 miR-7 抑制的靶分子的不足, 反之, 以基因芯片技术克服 iTRAQ 技术对低丰度蛋白敏感性不高的缺陷, 二者结合将能够在基因的 mRNA 和蛋白质水平较为全面地筛选 miR-7 的功能靶分子; 其次, 将高通量筛选结果与生物信息学预测结果相关联, 目的在于以高通量筛选结果排除生物信息学预测结果中的假阳性部分, 同时, 以生物信息学预测结果区分出高通量筛选结果中的 miR-7 直接靶分子, 二者联合将能够筛选出 miR-7 的直接功能靶分子。通过这一筛选策略, 我们的结果表明: 转染 miR-7 后, 基因芯片筛选出 331 个差异表达的基因, iTRAQ 技术筛选出 133 个差异表达的蛋白, 证明 miR-7 能够影响胃癌细胞中大量基因的表达, 进一步提示其在调控胃癌发生和发展中的重要作用; 在联合基因芯片和 iTRAQ 技术所筛选出的基因中, 包括了 EGFR<sup>[81]</sup>、IGF1R<sup>[83]</sup>、PIK3R3<sup>[85]</sup>和 YY1<sup>[88]</sup>等前期已被证实的 miR-7 靶

分子, 表明我们筛选策略的可靠性; 在基因芯片筛选出的结果中, 我们发现转录因子 AP-1 的重要成员 FOS 在转染 miR-7 的细胞中下调明显, 而未在 iTRAQ 技术筛选的数据中发现差异, 后续双荧光素酶报告基因实验进一步证实 FOS 是 miR-7 的直接靶分子, 表明基因芯片对检测低丰度差异基因的敏感性优于 iTRAQ, 也进一步提示联合基因芯片和 iTRAQ 技术筛选结果的必要性; 在联合基因芯片和 iTRAQ 技术所筛选出的基因中, 通过生物信息学预测, 我们发现在转染 miR-7 后 39 个表达显著下调的基因中, 16 个基因含有 1 个以上 miR-7 的结合位点, 表明我们的高通量筛选策略对的 miRNA 的直接靶分子具有较高的富集率。上述结果共同表明, 联合基因芯片、蛋白质组学 iTRAQ 技术和生物信息学方法, 能够在降低预测结果假阳性率的同时区分出直接和间接靶分子, 从而有效地提高 miRNA 靶分子的筛选效率。

根据本文文献回顾部分中的观点, miRNA 调控作用发挥的关键可能是对某些肿瘤信号转导通路的相关分子或某些关键转录因子的抑制。据此, 我们在筛选出的 miR-7 候选靶分子中, 重点关注这两类分子。据文献报道, miR-7 主要调控两条肿瘤信号转导通路, 即 EGFR 通路和 IGF1R 通路。在 EGFR 介导的信号转导通路中, miR-7 能够靶向 EGFR/Ras/Raf/MEK/ERK1/2 通路中的 EGFR、Raf-1、Stat3、MEK 和 Akt 等分子, 从而抑制肺癌、乳腺癌和胶质瘤细胞的生长; 此外, miR-7 还能够靶向肝癌细胞中的 EGFR/PI3K/Akt/mTOR 通路<sup>[78]</sup>。在 IGF1R 介导的信号转导通路中, miR-7 能够靶向 IGF1R/IRS/PI3K/Akt 通路中的 IGF1R、IRS-1 和 IRS-2 等分子<sup>[78]</sup>。在我们筛选出的 miR-7 候选靶分子中, 包括了 EGFR 和 IGF1R, 提示这两条肿瘤信号通路参与了 miR-7 对胃癌的调控。近年研究表明, IGF1R 通路异常活化能够促进肿瘤细胞的迁移、侵袭及血管生成等过程, 与肿瘤转移过程密切相关<sup>[117]</sup>。由此, 我们推测 miR-7 可能通过抑制 IGF1R 调控胃癌细胞侵袭和转移。与此同时, 我们注意到, 候选靶分子中 RELA 和 FOS 分别是转录因子 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 家族的重要成员, 其表达在转染 miR-7 后显著下调, 且这两个基因的 3'-UTR 中分别存在 2 个和 3 个保守性较高的 miR-7 结合位点。大量研究表明, NF- $\kappa$ B 和 AP-1 直接参与调控了多种肿瘤的增殖与凋亡过程<sup>[118, 119]</sup>。由此, 我们推测 RELA 和 FOS 可能是 miR-7 下游的重要靶分子, 可能介导了 miR-7 对胃癌细胞增殖表型的抑制作用。由于尚未有报道 miR-7 在肿瘤中调控 RELA 或 FOS, 亦未见报道 miR-7 在胃癌中调控 IGF1R, 因此, 我们的推测是否正确, 还有待于进一步研究 miR-7 对 RELA、FOS 和 IGF1R 的调控机制。

## 第四部分 miR-7 调控胃癌发生的机制研究

RELA 和 FOS 分别是转录因子 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 家族的重要成员，直接参与调控多种肿瘤中的增殖和凋亡。据此，我们推测 miR-7 负性调控 RELA 和 FOS 可能是介导 miR-7 抑癌功能的重要机制。此外，有研究指出胃癌中 miR-7 的表达与炎症因子水平呈负相关，提示 miR-7 可能是关联炎症与肿瘤发生过程的重要环节。本部分实验研究了 miR-7 对 RELA 和 FOS 的调控作用在胃癌细胞增殖凋亡等表型中的影响，发现了 miR-7 与 NF- $\kappa$ B 这一调控炎症与肿瘤的重要信号通路间的相互调控关系，并揭示了幽门螺杆菌感染可能是导致胃上皮细胞中 miR-7 表达下调的重要原因。

### 1 材料

#### 1.1 载体

基因表达和 shRNA 干扰载体采用 pcDNA3.1 质粒，双萤光素酶报告基因载体采用 psi-CHECK-2 质粒，NF- $\kappa$ B 活性检测采用 pNF- $\kappa$ B-Luc 质粒。

#### 1.2 细胞系

GES 细胞、BGC823 细胞和 SGC7901 细胞来源同第一部分 1.1。

#### 1.3 组织芯片

胃癌组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司。

#### 1.4 实验动物

6-8 周龄雌性 BALB/C 裸鼠购自第四军医大学实验动物中心。

#### 1.5 主要试剂

细胞培养基	Hyclone 公司
胎牛血清	Hyclone 公司
胰蛋白酶	Hyclone 公司
Lipofectamine 2000	Invitrogen 公司

miRNeasy Mini Kit	Qiagen 公司
TaqMan MicroRNA Assay	AB 公司
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	AB 公司
TaqMan Fast Advanced Master Mix	AB 公司

## 1.6 主要仪器

CO <sub>2</sub> 细胞培养箱	Thermo 公司
超净工作台	Thermo 公司
超低温冰箱	Thermo 公司
光学显微镜	Olympus 公司
台式高速离心机	Eppendorf 公司
纯水仪	Millipore 公司
多功能酶标仪	Thermo 公司
快速转膜仪	Bio-Rad 公司
共聚焦显微镜	Olympus 公司
普通 PCR 仪	AB 公司
实时定量 PCR 仪	AB 公司
ChemiDox XRS 凝胶成像系统	Bio-Rad 公司

## 2 方法

### 2.1 过表达或沉默 RLEA 和 FOS 对胃癌细胞增殖能力的影响

#### 2.1.1 构建 RELA 和 FOS 的表达和 siRNA/shRNA 干扰载体

方法同第三部分 2.5.1。

#### 2.1.2 在胃癌细胞中转染 RELA 和 FOS 的表达载体和 siRNA

除转染试剂使用 Lipofectamine 2000 外，其余方法同第二部分 2.1.2。

#### 2.1.3 Western blot 检测 RELA 和 FOS 的过表达和 siRNA 干扰效率

方法同第三部分 2.7。

#### 2.1.4 功能实验检测 RLEA 和（或）FOS 对胃癌细胞增殖能力的影响

方法同第二部分 2.2.1 和 2.2.2。

### 2.1.5 功能挽救实验检测 miR-7 通过调控 RLEA 和 FOS 对胃癌细胞增殖能力的影响

共转染方法同第三部分 2.5.2，功能实验方法同第二部分 2.2.1 和 2.2.2。

## 2.2 萤光素酶报告基因系统检测 miR-7 对 IKK $\epsilon$ 的直接调控作用

### 2.2.1 构建 IKK $\epsilon$ 的野生型与突变型报告基因载体

方法同第三部分 2.5.1。

### 2.2.2 共转染 miR-7 和萤光素酶报告基因载体

方法同第三部分 2.5.2。

### 2.2.3 检测 miR-7 对各报告基因载体萤光素酶活性的影响

方法同第三部分 2.5.3。

## 2.3 ChIP 验证 RELA 与 miR-7 启动子区域的结合

- 1) miR-7 启动子区域转录因子结合位点分析：使用 UCSC 基因组浏览器 (<http://genome.ucsc.edu/>) 对 miR-7 编码基因的 DNA 序列之前 2 kb 进行 NF- $\kappa$ B 结合位点分析。
- 2) 细胞交联与超声破碎：取处于对数生长期的细胞，加入 1% 甲醛，37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min；加甘氨酸至终浓度为 0.125 M 以终止交联；使用预冷至 4 $^{\circ}$ C 的 PBS 漂洗 3 次；离心 5 min (4 $^{\circ}$ C, 1000 $\times$ g) 收集细胞；移除上清，加入 SDS Lysis Buffer，使得细胞终浓度为  $1 \times 10^7$ /ml 个细胞；加入蛋白酶抑制剂；使用超声破碎仪破碎细胞，4.5 sec 冲击，9 sec 间隙，共 14 个循环。
- 3) 除杂及抗体哺育：离心 10 min (4 $^{\circ}$ C, 10000 $\times$ g) 去除沉淀；分别取 100  $\mu$ l 上清液加入 RELA 抗体作为实验组；100  $\mu$ l 不加抗体作为对照组；在 100  $\mu$ l 超声破碎产物中，加入 900  $\mu$ l ChIP Dilution Buffer 和 20  $\mu$ l 50 $\times$ PIC；各加入 60  $\mu$ l Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA，4 $^{\circ}$ C 颠转混匀 1 hr；离心 1 min (4 $^{\circ}$ C, 700 $\times$ g)；取上清，各留取 20  $\mu$ l 做为 input；在实验组中加入 1  $\mu$ l RELA 抗体，对照组中则不加抗体，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- 4) 免疫复合物的沉淀及清洗：每管中加入 60  $\mu$ l Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA，4 $^{\circ}$ C 颠转混匀 2 hr；离心 1 min (4 $^{\circ}$ C, 700 $\times$ g)；移除上清，使用洗涤溶液依次清洗沉淀复合物；每管加入 250  $\mu$ l 洗脱 buffer，室温下颠转混匀 15 min，离心收集上清，此步骤重复 2 次，使最终的洗脱液体积为 500  $\mu$ l；混匀后，65 $^{\circ}$ C 解交联过

夜。

- 5) DNA 样品的回收：每管加入 1  $\mu\text{l}$  RNaseA, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 hr; 每管加入 10  $\mu\text{l}$  0.5 M EDTA、20  $\mu\text{l}$  1M Tris-HCl、2  $\mu\text{l}$  10 mg/ml 蛋白酶 K, 45 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 hr; 回收 DNA 片段, 溶于 100  $\mu\text{l}$  去离子水中后, 进行 PCR 分析。

## 2.4 miR-7 对胃癌细胞中 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

### 2.4.1 免疫荧光检测 miR-7 对 IKK 和 RELA 在细胞内表达和定位的影响

- 1) 接种细胞：胃癌细胞转染 miR-7 mimic 或 inhibitor 48 hr 后, 胰蛋白酶消化细胞, 以适当密度接种至免疫荧光细胞培养小室常规培养。
- 2) 固定细胞：当细胞贴壁生长至适宜融合度时, 移除培养液, PBS 漂洗 3 次; 移除 PBS, 在小室内加入 100  $\mu\text{l}$  4% 多聚甲醛, 室温静置 15 min; 移除多聚甲醛, PBS 漂洗 5 min, 重复 3 次。
- 3) 细胞通透化：移除 PBS, 在小室内加入 100  $\mu\text{l}$  0.5% Triton, 室温静置 15 min; 移除 Triton, PBS 漂洗 5 min, 重复 3 次。
- 4) 封闭：移除 PBS, 滴加山羊血清封闭液, 室温静置 30 min。
- 5) 一抗孵育：移除封闭液; 按照适当比稀释一抗, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$  湿盒内孵育过夜。
- 6) 二抗孵育：移除一抗孵育液, PBS 洗涤 5 min, 重复洗涤 3 次; 按照适当比稀释二抗, 置于室温避光孵育 1 hr。
- 7) 细胞核染色：移除一抗孵育液, PBS 洗涤 5 min, 重复洗涤 3 次; 移除 PBS, DAPI 非特异性染细胞核 15 min。
- 8) 荧光检测：移除 DAPI 染色液, PBS 洗涤 5 min, 重复洗涤 3 次; 封片, 共聚焦显微镜观察荧光表达。

### 2.4.2 实时定量 PCR 检测 miR-7 对 NF- $\kappa$ B 信号通路下游效应分子表达的影响

方法同第一部分 2.3。

## 2.5 幽门螺杆菌感染对 miR-7 生成的影响

### 2.5.1 启动子报告基因检测 NF- $\kappa$ B 转录活性的影响

方法同第一部分 2.3。

### 2.5.2 实时定量 PCR 检测 pri-miR-7 表达水平

方法同第一部分 2.3。

## 2.6 IHC 检测胃癌组织芯片中 RELA 和 FOS 的表达

### 2.6.1 IHC 检测 RELA 和 FOS 表达

- 1) 常规脱蜡复水: 将组织芯片置于 60℃ 恒温箱中烘烤约 1 hr; 将组织芯片置于二甲苯中 10 min, 重复 3 次; 再将其依次置于 99.9 %、96 % 和 70% 的乙醇中 5 min, 重复 3 次; 最后将其置于 PBS 中, 漂洗 5 min。
- 2) 抗原修复: 将组织芯片置于 0.01 mol/l 柠檬酸钠抗原修复液中煮沸 15 min, 待修复液自然冷却后取出。
- 3) 灭活内源性过氧化物酶: 将组织芯片置于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中 15 min, 以灭活内源性过氧化物酶。
- 4) 封闭: PBS 洗涤 5 min, 重复洗涤 3 次; 滴加血清封闭液, 室温孵育 30 min。
- 5) 一抗孵育: 移除封闭液; 按照适当比稀释 RELA 和 FOS 一抗, 置于 4℃ 湿盒内孵育过夜。
- 6) 二抗孵育: 移除一抗孵育液, PBS 洗涤 5 min, 重复洗涤 3 次; 按照适当比稀释二抗, 置于室温孵育 1 hr。
- 7) DAB 显色: 移除二抗孵育液, PBS 洗涤 5 min, 重复洗涤 3 次; 滴加 DAB 显色, 置于显微镜下观察显色情况并适时终止显色。
- 8) 细胞核染色: 苏木精染细胞核 3 min, 流水冲洗 20 min; 1% 盐酸酒精分化 2 sec; 0.1% 氨水返蓝 30 sec。
- 9) 脱水、封片: 将组织芯片依次置于 70 %、96 % 和 99.9 % 的乙醇中 10 min; 滴加封片液, 使用中性树脂胶封片。

### 2.6.2 组织芯片 ISH 结果判读标准和统计分析

方法同第一部分 2.4.2

## 3 结果

### 3.1 miR-7 通过调控 RELA 和 FOS 抑制胃癌增殖

#### 3.1.1 构建 RELA 和 FOS 的功能获得和功能缺失细胞模型

构建包含 RELA 和 FOS 蛋白编码序列和 3'-UTR 区域的过表达载体, 分别命名为野生型 RELA (包含 RELA 的蛋白编码序列和野生型 3'-UTR 区域)、突变型 RELA (包含 RELA 的蛋白编码序列和 miR-7 的 2 个结合位点突变的 3'-UTR 区域)、野生

型 FOS (包含 FOS 的蛋白编码序列和野生型 3'-UTR 区域) 和突变型 FOS (包含 FOS 的蛋白编码序列和 miR-7 的 3 个结合位点突变的 3'-UTR 区域)。瞬时转染 BGC823 和 SGC7901 细胞后, 利用 Western blot 检测 RELA 和 FOS 的蛋白表达, 结果表明 RELA 和 FOS 的过表达载体成功上调了细胞内 RELA 和 FOS 的蛋白水平 (图 4-1A)。设计并合成 RELA 和 FOS 的 siRNA, 瞬时转染 BGC823 和 SGC7901 细胞后, 利用 Western blot 检测 RELA 和 FOS 的蛋白表达, 结果表明 siRELA#3 和 siFOS#2 明显下调了细胞内 RELA 和 FOS 的蛋白水平 (图 4-1B)。上述结果表明, 通过转染 RELA 和 FOS 的过表达载体和 siRNA, 成功构建了 RELA 和 FOS 的功能获得和功能缺失细胞模型。

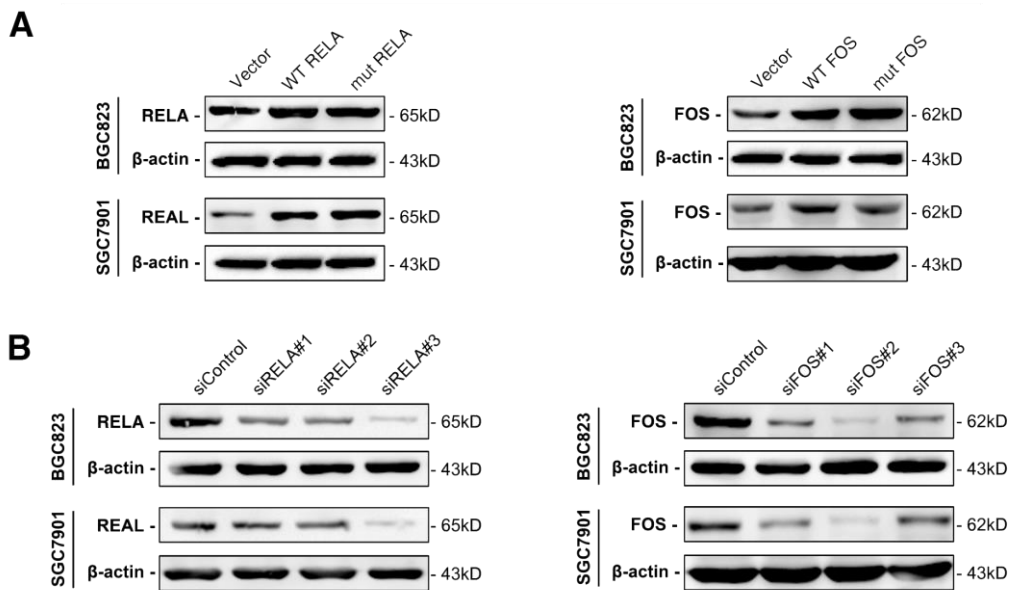


图 4-1 Western blot 验证 RELA 和 FOS 的表达载体和 siRNA 的转染效率

**A:** Western blot 验证 RELA 和 FOS 的表达载体的表达效率; **B:** Western blot 验证 RELA 和 FOS siRNA 的干扰效率。

### 3.1.2 沉默 RELA 和 FOS 抑制胃癌细胞增殖

在 BGC823 细胞中, 通过瞬时转染 RELA 或 (和) FOS 的 siRNA, 利用 MTT 法检测 RELA 和 FOS 对胃癌细胞体外增殖活性的影响并绘制生长曲线, 结果表明下调 RELA 或 (和) FOS 后 BGC823 细胞的存活率低于对照组 (图 4-2A)。进一步通过转染 RELA 和 FOS 的 shRNA 干扰载体, 利用平板集落形成实验, 结果表明下调 RELA 或 (和) FOS 后 BGC823 细胞的集落形成数明显少于对照组 (图 4-2B)。上述结果表明, 沉默 RELA 和 FOS 能够抑制胃癌细胞增殖。



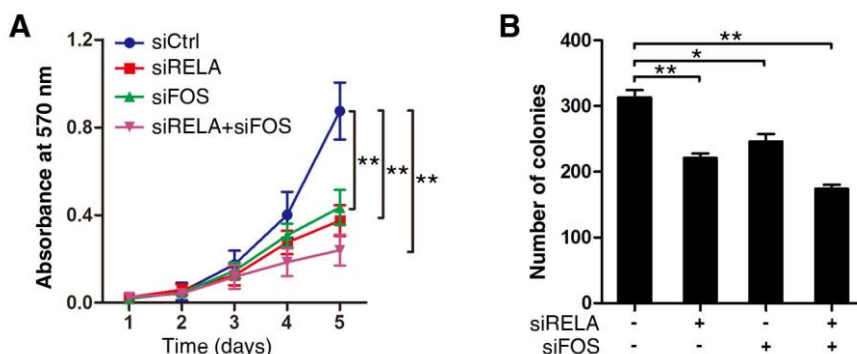


图 4-2 沉默 RELA 和（或）FOS 对胃癌细胞体外生长过程的影响

**A:** 沉默 RELA 或（和）FOS 抑制对胃癌细胞的增殖能力；**B:** 沉默 RELA 或（和）FOS 抑制对胃癌细胞的集落形成能力。

### 3.1.2 过表达突变型 RELA 和 FOS 逆转 miR-7 对胃癌细胞增殖的抑制作用

为进一步明确 miR-7 与 RELA 和 FOS 在胃癌增殖表型中的调控关系,在 BGC823 和 SGC7901 细胞中,通过共转染 miR-7 与 RELA 或 FOS 的野生型和突变型过表达载体,利用 MTT 法检测其对胃癌细胞体外增殖活性的影响并绘制生长曲线,结果表明:共转染 miR-7 和野生型 RELA 或 FOS 过表达载体时,BGC823 和 SGC7901 细胞的存活率低于对照组;共转染 miR-7 和突变型 RELA 或 FOS 过表达载体时,BGC823 和 SGC7901 细胞的存活率低于共转染 miR-7 和野生型 RELA 或 FOS 过表达载体组(图 4-3)。进一步通过平板集落形成实验表明:共转染 miR-7 和野生型 RELA 或 FOS 过表达载体时,BGC823 和 SGC7901 细胞的集落形成数明显少于对照组;共转染 miR-7 和突变型 RELA 或 FOS 过表达载体时,BGC823 和 SGC7901 细胞的集落形成数则多于共转染 miR-7 和野生型 RELA 或 FOS 过表达载体组(图 4-3)。上述结果表明,过表达突变型 RELA 和 FOS 能够部分逆转 miR-7 对胃癌细胞增殖的抑制作用。

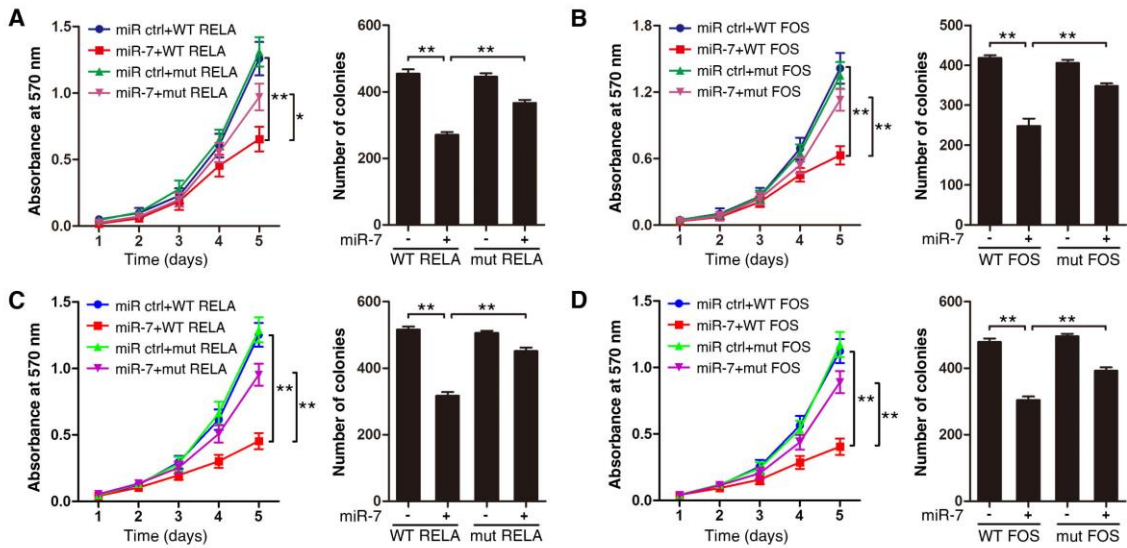


图 4-3 共转染 miR-7 和 RELA 或 FOS 对胃癌细胞体外增殖能力的影响

**A:** 共转染 miR-7 和 RELA 对 BGC823 细胞生长曲线（左）和集落形成（右）能力的影响；**B:** 共转染 miR-7 和 RELA 对 SGC7901 细胞生长曲线（左）和集落形成（右）能力的影响；**C:** 共转染 miR-7 和 FOS 对 BGC823 细胞生长曲线（左）和集落形成（右）能力的影响；**D:** 共转染 miR-7 和 FOS 对 SGC7901 细胞生长曲线（左）和集落形成（右）能力的影响。

### 3.2 miR-7 与 NF- $\kappa$ B 构成双负反馈调控环路

#### 3.2.1 miR-7 通过调控 IKK $\epsilon$ 抑制 RELA 激活

使用脂多糖（LPS）诱导胃粘膜上皮细胞 GES 中 NF- $\kappa$ B 信号转导通路激活，同时瞬时转染 miR-7，利用 Western blot 检测 miR-7 对 NF- $\kappa$ B 信号转导通路中各分子蛋白表达的影响。结果表明，上调 miR-7 不仅抑制 RELA 的蛋白表达，并且降低了磷酸化 RELA 的水平；下调 miR-7 促进 RELA 的蛋白表达的同时，也促进 RELA 的磷酸化水平（图 4-4）。Western blot 结果进一步显示，上调 miR-7 能抑制 RELA 的上游磷酸化调控分子 I $\kappa$ B- $\alpha$  的蛋白表达，并促进其磷酸化；下调 miR-7 促进 I $\kappa$ B- $\alpha$  的蛋白表达，并抑制其磷酸化（图 4-4）。上述结果表明，miR-7 不仅能够抑制 RELA 的蛋白表达，并且能够调控 RELA 的磷酸化，并提示 miR-7 可能对 I $\kappa$ B- $\alpha$  的磷酸化过程发挥调控作用。

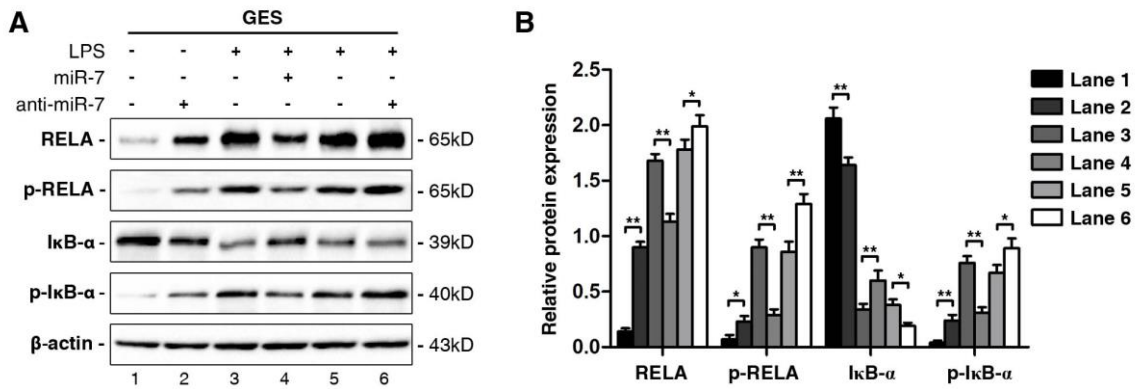


图 4-4 miR-7 对 NF-κB 信号转导通路相关分子的影响

**A:** miR-7 对 LPS 诱导活化后 NF-κB 信号转导通路相关分子蛋白表达的影响；**B:** 对应 Western blot 条带的灰度值定量分析。

通过对调控 IκB-α 磷酸化水平的 IκB 激酶 IKKα、IKKβ、IKKε 和 TBK1 的 3'-UTR 区域进行生物信息学预测分析, 结果表明在 IKKα 和 IKKε 的 3'-UTR 区域分别存在 miR-7 的 1 个结合位点 (图 4-5A)。使用 miR-7 mimic 和 miR-7 inhibitor 及其阴性对照, 分别瞬时转染 BGC823 和 SGC7901 细胞。利用 Western blot 检测 miR-7 对 IKKα 和 IKKε 蛋白表达的影响, 结果表明: 上调 miR-7 后 BGC823 和 SGC7901 细胞中 IKKε 的蛋白表达均下降, 下调 miR-7 后 BGC823 和 SGC7901 细胞中 IKKε 的蛋白表达均上升; 而上下调 miR-7 对 BGC823 和 SGC7901 细胞中 IKKα 的蛋白表达均无明显影响 (图 4-5B), 提示 miR-7 对 IKKα 的蛋白表达无调控作用, 其对 IκB-α 磷酸化的调控可能是通过 IKKε 介导的。根据上述分析, 分别构建包含 IKBKE (IKKε 编码基因) 的野生型和突变型 3'-UTR 的荧光素酶报告基因载体 (图 4-5A), 利用双荧光素酶报告基因实验, 检测 miR-7 是否通过结合 3'-UTR 上的结合位点负向调控 IKKε 的表达, 结果显示: 上调 miR-7 可抑制含有其结合位点的 IKBKE 野生型 3'-UTR 报告基因的荧光强度, 而对于突变型质粒的荧光强度则无明显影响; 但下调 miR-7 对 IKBKE 野生型和突变型 3'-UTR 报告基因的荧光强度均无明显影响 (图 4-5C)。值得注意的是, 利用实时定量 PCR 检测 miR-7 对 IKBKE 基因 mRNA 表达水平的影响, 结果表明上下调 miR-7 对 IKBKE 的 mRNA 表达均无明显影响 (图 4-5D), 说明 miR-7 仅在蛋白水平抑制 IKBKE 基因的表达。上述结果表明, miR-7 能够在转录后水平负性调控 IKKε 表达, 提示 miR-7 通过抑制 IKKε 表达, 从而降低 IκB-α 磷酸化, 进而抑制 RELA 的磷酸化。

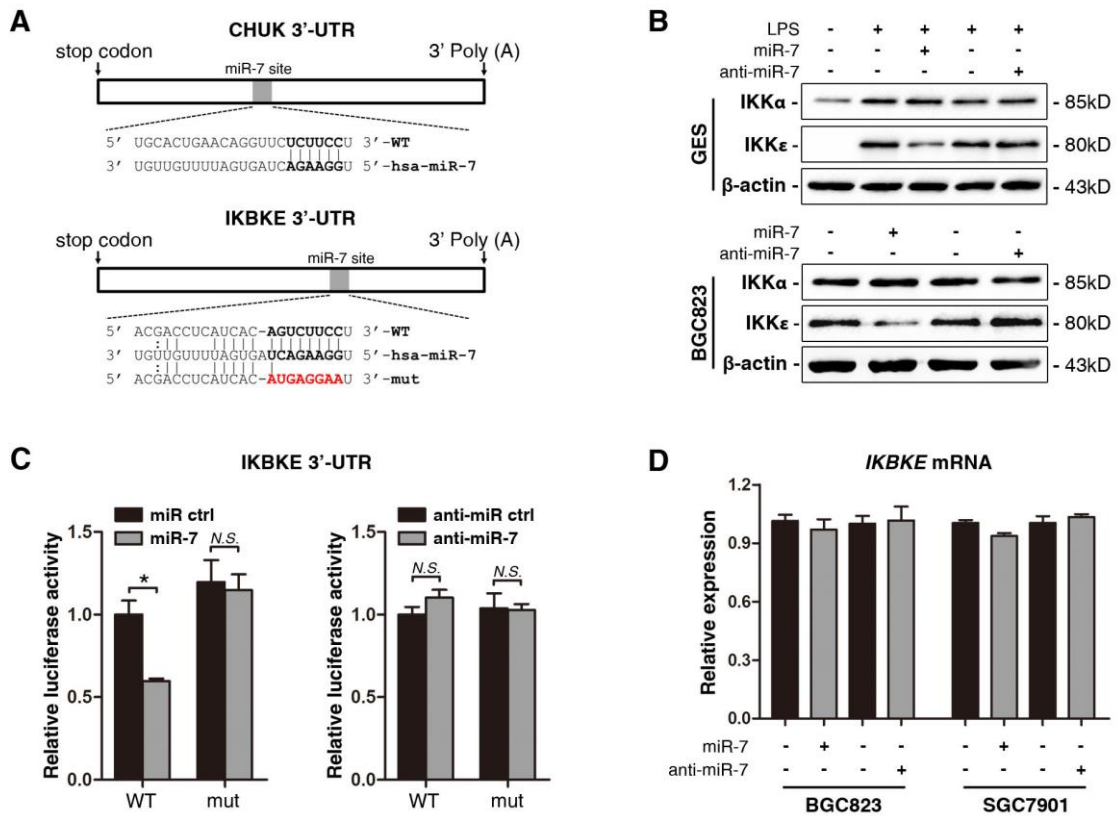


图 4-5 miR-7 在胃癌细胞中负向调控 IKKε

**A:** IKK $\alpha$  和 IKK $\epsilon$  编码基因 3'-UTR 的 miR-7 结合位点示意图; **B:** 上、下调 miR-7 对 GES 细胞和 BGC823 细胞中 IKK $\alpha$  和 IKK $\epsilon$  蛋白表达的影响; **C:** 双萤光素酶报告基因实验检测 miR-7 与 IKK $\epsilon$  基因的 3'-UTR 区的直接结合; **D:** 上、下调 miR-7 对 GES 细胞和 BGC823 细胞中 IKK $\alpha$  和 IKK $\epsilon$  编码基因 mRNA 表达的影响。

根据上述分析, 在 LPS 诱导 NF- $\kappa$ B 信号转导通路激活的 GES 细胞中, 通过共转染 miR-7 和 IKK $\epsilon$  的携带野生型或突变型 3'UTR 的表达载体, 利用 Western blot 检测 NF- $\kappa$ B 信号转导通路中各分子的蛋白表达变化。结果表明: 共转染 miR-7 和野生型 IKK $\epsilon$  过表达载体后, GES 细胞中 IKK $\epsilon$  蛋白表达较对照组下降, I $\kappa$ B- $\alpha$  表达上升, 磷酸化 I $\kappa$ B- $\alpha$ 、RELA 和磷酸化 RELA 的表达也均下降; 但共转染 miR-7 和突变型 IKK $\epsilon$  过表达载体后, GES 细胞中 IKK $\epsilon$  蛋白表达较对照组无明显变化, I $\kappa$ B- $\alpha$ 、磷酸化 I $\kappa$ B- $\alpha$ 、RELA 和磷酸化 RELA 的蛋白表达也未发生明显变化 (图 4-6)。上述结果表明, 突变 IKK $\epsilon$  基因 3'-UTR 中 miR-7 的结合位点后, miR-7 无法通过抑制 IKK $\epsilon$  表达调控 RELA 的活化过程。

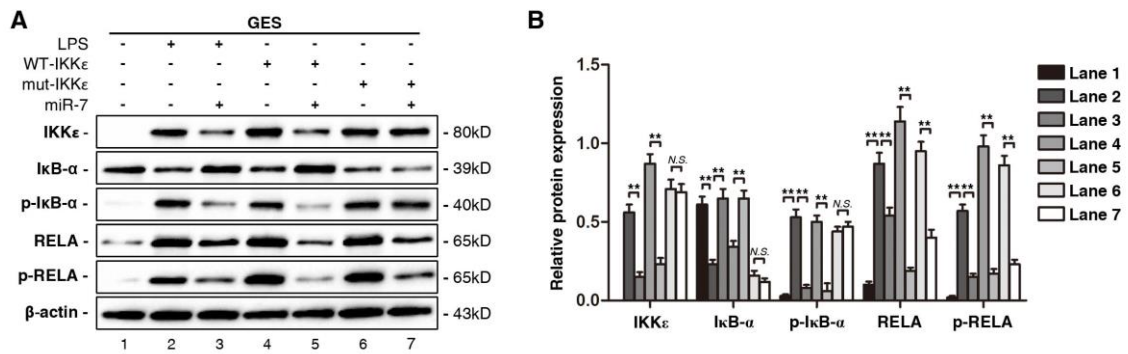


图 4-6 miR-7 通过负向调控 IKKε 抑制 RELA 激活

**A:** 共转染 miR-7 与 IKKε 的野生型或突变型 3'UTR 的表达载体后对 NF-κB 信号转导通路相关分子蛋白表达的影响；**B:** 对应 Western blot 条带的灰度值定量分析。

使用 miR-7 mimic、miR-7 inhibitor 及其阴性对照，分别瞬时转染 BGC823 细胞。利用间接免疫荧光染色方法,观察 miR-7 对 IKKε 和 RELA 在细胞中表达和定位情况的影响,结果表明:上调 miR-7 后 BGC823 细胞中 IKKε 和 RELA 的荧光强度较对照组均明显降低;下调 miR-7 后 BGC823 细胞中 IKKε 和 RELA 的荧光强度则明显升高,且可观察到 RELA 的核转位现象(图 4-7A)。进一步实时定量 PCR 方法,在 BGC823 和 SGC7901 细胞中观察 miR-7 对 NF-κB 下游经典效应分子 mRNA 表达的影响,结果表明上调 miR-7 后 BGC823 和 SGC7901 细胞中 Bcl-xL、Cyclin D1、c-Myc、Cox-2、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 等基因的表达均下降(图 4-7B)。上述结果表明,miR-7 能够抑制 IKKε 和 RELA,从而抑制 NF-κB 信号通路的活性。

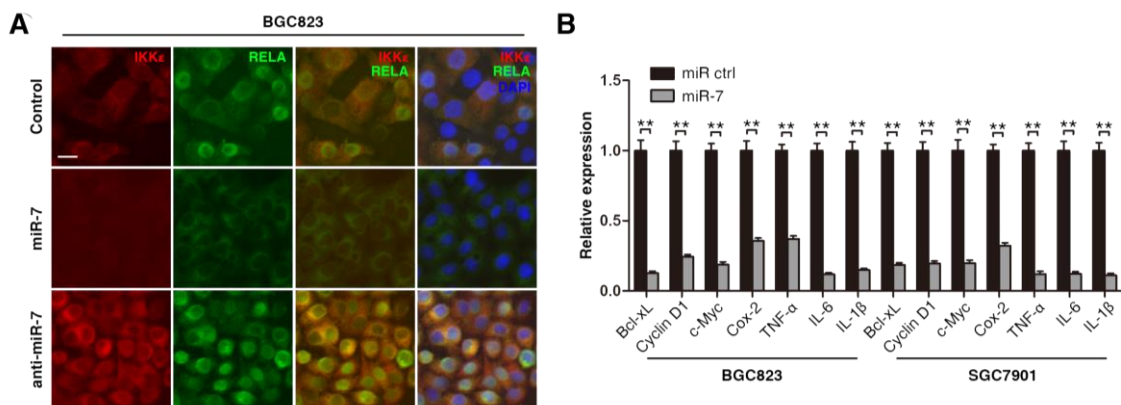


图 4-7 miR-7 负性调控 IKKε 和 RELA 抑制 NF-κB 信号通路活性

**A:** 上、下调 miR-7 对胃癌细胞内 IKKε 和 RELA 表达和定位的影响；**B:** 上调 miR-7 后对 NF-κB 下游效应分子基因表达的影响。



### 3.2.2 NF- $\kappa$ B 抑制 miR-7 转录

在 GES 细胞中，通过瞬时转染野生型 IKK $\epsilon$  和 RELA 过表达载体，利用实时定量 PCR 和 Northern blot 方法，检测其对 miR-7 的初始转录本（primary miR-7, pri-miR-7）和成熟体（mature miR-7）表达水平的影响。结果表明，与阴性对照相比，上调 IKK $\epsilon$  或 RELA 均可抑制 GES 细胞中 pri-miR-7 和成熟 miR-7 的表达(图 4-8A)。在 BGC823 细胞中，通过瞬时转染 IKK $\epsilon$  和 RELA 的 siRNA，利用实时定量 PCR 和 Northern blot 方法，检测其对 pri-miR-7 和成熟 miR-7 表达水平的影响。结果表明，与阴性对照相比，干扰 IKK $\epsilon$  或 RELA 均可促进 BGC823 细胞中 pri-miR-7 和成熟 miR-7 的表达（图 4-8B）。上述实验表明，IKK $\epsilon$  和 RELA 均能够抑制 miR-7 的转录，提示 NF- $\kappa$ B 信号通路能够抑制 miR-7 的转录。

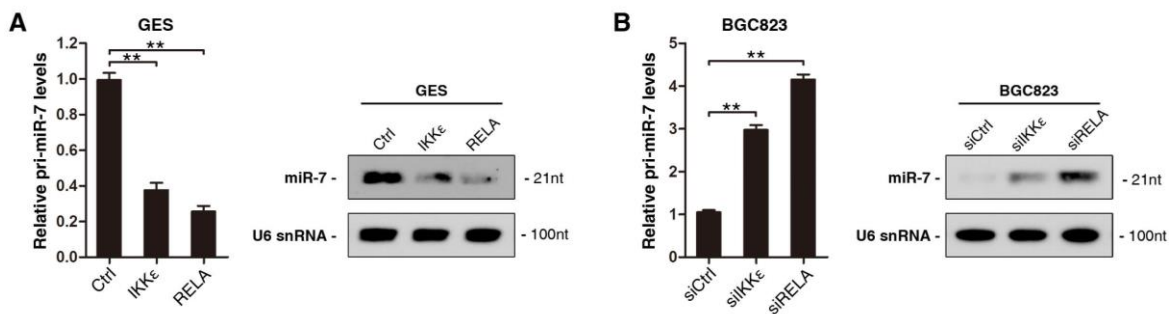


图 4-8 上下调 IKK $\epsilon$  和 RELA 对 pri-miR-7 表达水平的影响

**A:** GES 细胞中上调 IKK $\epsilon$  和 RELA 对 pri-miR-7（左）和成熟 miR-7（右）表达水平的影响；**B:** BGC823 细胞中下调 IKK $\epsilon$  和 RELA 对 pri-miR-7（左）和成熟 miR-7（右）表达水平的影响。

通过 UCSC Genome Browser 分析人类基因组中编码 miR-7 的 3 个编码基因序列上游的 2 kb 的启动子区域，分别发现 miR-7-1 上游存在 3 簇可能的 NF- $\kappa$ B 结合位点，miR-7-2 和 miR-7-3 各存在 2 簇可能的 NF- $\kappa$ B 结合位点（图 4-9A）。根据上述分析，利用 ChIP 实验检测 RELA 是否能与 miR-7 上游启动子区域的 NF- $\kappa$ B 结合位点结合，结果表明 RELA 在 BGC823 和 SGC7901 细胞中能与 miR-7-1 和 miR-7-2 的 NF- $\kappa$ B 结合位点相结合（图 4-9B）。上述实验表明，RELA 能直接结合 miR-7 的启动子区域。以上结果共同表明，RELA 能够通过直接结合 miR-7 的启动子区域，抑制 miR-7 的转录。

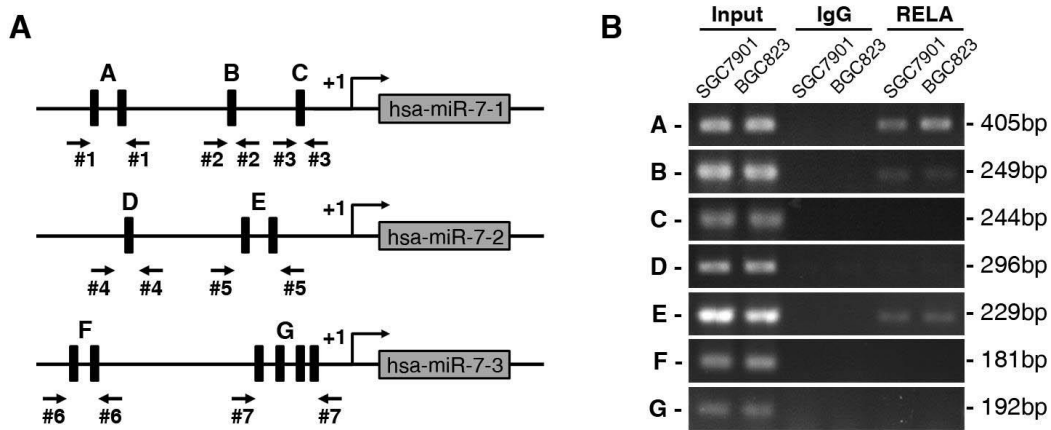


图 4-9 ChIP 实验验证 RELA 对 miR-7 启动子区域的直接结合

**A:** miR-7 编码基因序列启动子区域 NF- $\kappa$ B 结合位点示意图; **B:** ChIP 实验验证 RELA 对 miR-7 编码基因序列启动子区域的直接结合。

### 3.2.3 幽门螺杆菌感染抑制 miR-7 表达

将幽门螺杆菌与 GES 细胞共培养, 利用 Western blot 检测幽门螺杆菌感染对 IKK $\epsilon$  和 RELA 的影响, 结果表明幽门螺杆菌感染能够促进 IKK $\epsilon$  和 RELA 蛋白表达 (图 4-10A); 利用荧光素酶报告基因实验检测幽门螺杆菌感染对 NF- $\kappa$ B 转录活性的影响, 结果表明幽门螺杆菌感染能够增强 NF- $\kappa$ B 转录活性 (图 4-10B); 利用实时定量 PCR 方法检测幽门螺杆菌感染对 miR-7 转录的影响, 结果表明幽门螺杆菌感染能够抑制 miR-7 转录 (图 4-10C)。对 GES 细胞进行 NF- $\kappa$ B 抑制剂 BAY 11-7082 预处理后, 与幽门螺杆菌共培养, 进行上述实验, Western blot 结果表明 BAY 11-7082 预处理能抑制幽门螺杆菌感染对 IKK $\epsilon$  和 RELA 的表达促进 (图 4-10A); 启动子报告基因实验结果表明, BAY 11-7082 预处理能抑制幽门螺杆菌感染对 NF- $\kappa$ B 的转录活化 (图 4-10B); 实时定量 PCR 结果表明, BAY 11-7082 预处理能部分逆转幽门螺杆菌感染对 miR-7 的转录抑制 (图 4-10C)。上述结果表明, 幽门螺杆菌感染能够促进 IKK $\epsilon$  和 RELA 表达, 从而增强 NF- $\kappa$ B 转录活性, 进而抑制 miR-7 转录和表达。

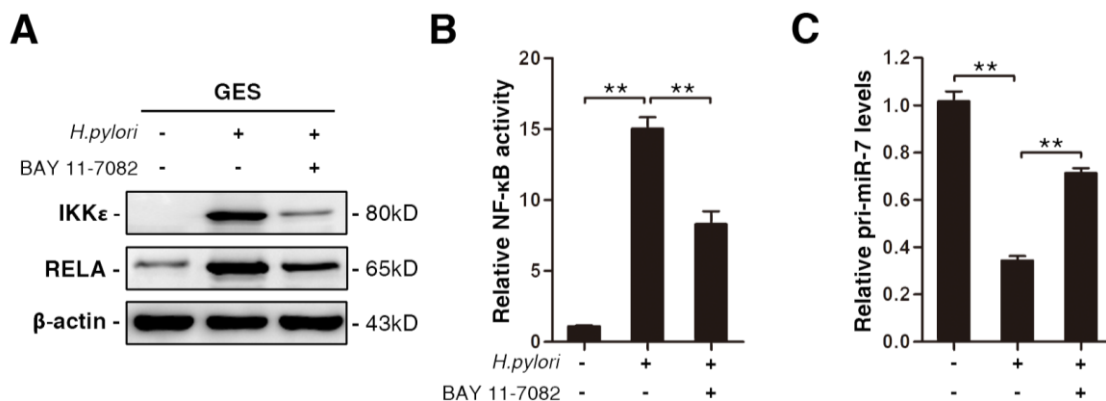


图 4-10 幽门螺杆菌感染对胃上皮细胞中 miR-7 表达的影响

**A:** 幽门螺杆菌感染和 NF-κB 抑制剂处理对胃上皮细胞中 IKKε 和 RELA 表达影响；  
**B:** 幽门螺杆菌感染和 NF-κB 抑制剂处理对 NF-κB 转录活性的影响；  
**C:** 幽门螺杆菌感染和 NF-κB 抑制剂处理对胃上皮细胞中 pri-miR-7 表达的影响。

### 3.3 miR-7 与 RELA 及 FOS 在胃癌组织中表达水平呈负相关

利用实时定量 PCR 方法，分别检测 20 例胃癌样本中 RELA 和 FOS 的 mRNA 水平，并对其与 miR-7 的表达水平进行相关性分析。结果表明：RELA 在 80% (16/20) 的胃癌组织中的表达高于癌旁非肿瘤组织，其表达随胃癌恶性程度的增高而上升，RELA 与 miR-7 的表达水平呈负相关，相关系数为 0.681 (图 4-11A)；FOS 在 85% (17/20) 的胃癌组织中的表达高于癌旁非肿瘤组织，其表达随胃癌恶性程度的增高而上升，FOS 与 miR-7 的表达水平呈负相关，相关系数为 0.620 (图 4-11B)。

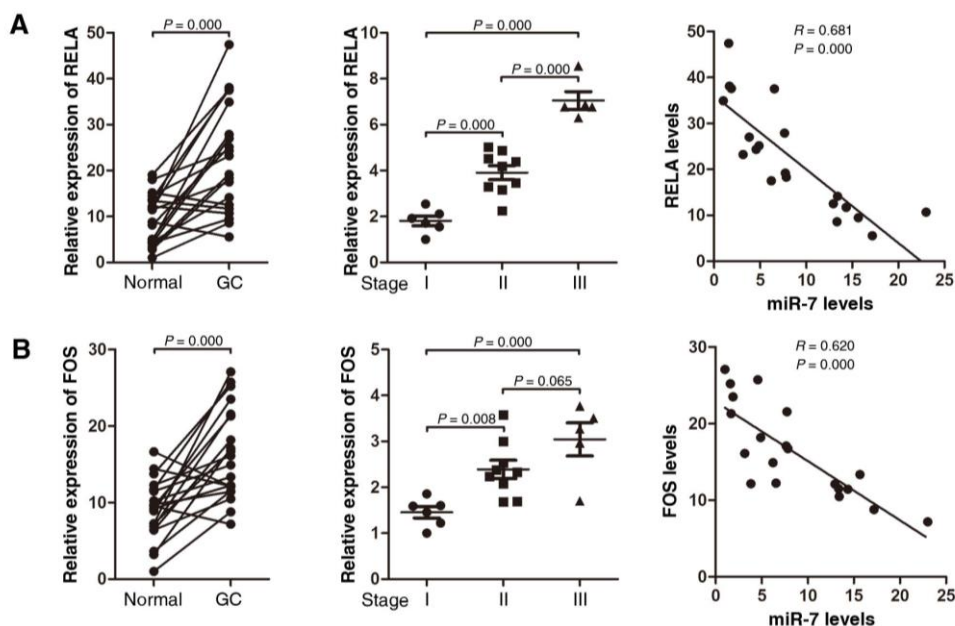


图 4-11 miR-7 与 RELA 及 FOS 在胃癌组织中表达水平呈负相关



**A:** RELA 在 20 对胃癌和癌旁组织中的表达 (左), RELA 在 20 例按 TNM 分期归类的胃癌组织中的表达 (中), miR-7 与 RELA 在胃癌组织中表达水平呈负相关 (右);  
**B:** FOS 在 20 对胃癌和癌旁组织中的表达 (左), FOS 在 20 例按 TNM 分期归类的胃癌组织中的表达 (中), miR-7 与 FOS 在胃癌组织中表达水平呈负相关 (右)。

使用胃癌组织芯片, 利用 IHC 染色方法, 分别检测胃癌组织中 RELA 和 FOS 的表达。结合本文第一部分利用同一组织芯片检测 miR-7 表达的结果, 通过相关性分析表明, miR-7 与 RELA 和 FOS 在胃癌组织中的表达呈负相关 (图 4-12)。

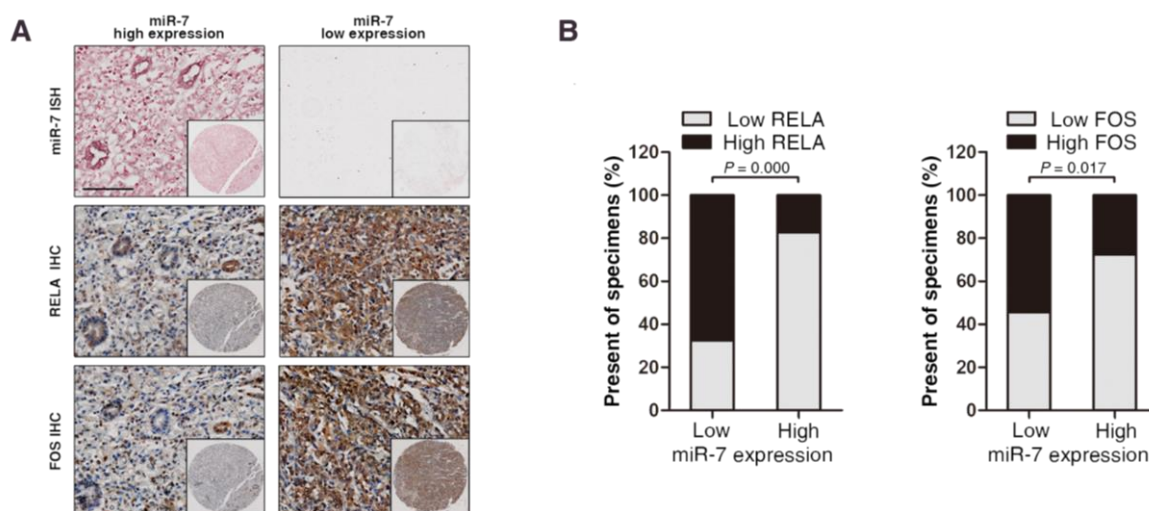


图 4-12 miR-7 与 RELA 和 FOS 在胃癌组织中的表达呈负相关

**A:** miR-7 与 RELA 和 FOS 在胃癌组织芯片中表达的代表性图片; **B:** miR-7 与 RELA 和 FOS 在胃癌组织芯片中表达的统计分析。

## 4 讨论

转录因子是真核生物基因表达调控中研究最为广泛的一类反式作用因子, 其本质是细胞核蛋白, 通过结合顺式作用元件中相应的转录因子结合位点, 激活或抑制基因的转录。目前, 人类基因组中发现转录因子的数量已超过 1500 个, 可划分成 100 多个转录因子家族<sup>[120]</sup>。转录因子和 miRNA 同是细胞内最大的两类基因表达调控因子, 在进化上都具有高度保守性, 虽然二者中一个是蛋白质, 参与基因转录调控, 另一个是核苷酸, 介导基因的转录后调控, 但越来越多的证据显示, 它们能够协调发挥作用, 在基因表达调控网络中密切相关: 首先, 转录因子和 miRNA 作为基因表达调控因子的共性决定了它们的相关性。转录因子和 miRNA 的表达都具有显著的时

间特异性和空间特异性，即二者都在某种特定的细胞或组织类型中表达，而这种表达特异性的结果即外化为它们所调控的靶分子在细胞生命活动的特定阶段或特定部位被激活或抑制，进而决定细胞命运。研究表明，转录因子介导的转录调控过程的复杂性与 miRNA 介导的转录后调控的复杂性呈正相关。Cui 等发现在人体胚胎干细胞发育过程中，发育基因所受到转录因子调控的数量越多，其所受调控的 miRNA 数量也越多<sup>[121]</sup>。此外，转录因子和 miRNA 间能形成基因表达的调控环路，包括负反馈环（feedback loop）和前反馈环（feed-forward loop），这两种反馈环路构成了基因表达网络的最基本的单位，称为网络基序（network motif）。网络基序的异常是引起肿瘤发生的重要因素<sup>[122]</sup>。其次，转录因子和 miRNA 在基因调控的功能和机制上的差异性决定了它们的互补性。一般来说，转录因子决定基因表达的时间和空间，是基因表达的“开关”，而 miRNA 并不能决定基因表达与否，只对基因表达的“量”进行“微调”（fine-tuning）。试想，如果 miRNA 对基因组内所有基因进行调控，尽管存在单个 miRNA 靶向多个基因的可能，也必然导致细胞对 miRNA 表达数量的巨大需求和调控效率低下的实际结果，但如果 miRNA 通过调控转录因子实现对下游多个效应分子基因表达的调控，则是一种高效率、低耗能的方式，更符合生物进化的基本规律。此外，Hu 等在多种肿瘤细胞系中发现 miR-504 通过抑制重要的抑癌转录因子 p53，阻遏后者所诱导的细胞凋亡和细胞周期停滞，促进肿瘤生长<sup>[123]</sup>。Park 等上皮来源性肿瘤中发现 miR-200 家族成员通过靶向调控 E-cadherin 的转录因子抑制 ZEB1 和 ZEB2，抑制肿瘤细胞发生 EMT<sup>[124]</sup>。可见，这种 miRNA 通过靶向转录因子调控基因表达的模式具有普遍性。另一方面，转录因子和 miRNA 的发挥作用的部位和效率也不尽相同：转录因子在细胞核内对整个细胞中某些基因的表达水平进行调控，而 miRNA 则在特定的亚细胞区域调控基因表达；miRNA 为非编码 RNA，合成迅速，较快地抑制胞浆中核糖体上的蛋白表达，此过程也有可逆性，只需将 miRNA 的靶分子 mRNA 转移到有活性的核糖体即可恢复基因表达，而转录因子是蛋白质，自身的合成需经历转录、翻译和修饰过程，且需要在核内形成复杂的转录复合体，反应和持续时间都较长<sup>[42]</sup>。由此可见，转录因子和 miRNA 在基因表达调控过程中即相互关联，又相互补充。

转录因子 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 参与了肿瘤的发生和发展，它们在调控肿瘤细胞增殖和凋亡过程中发挥的重要作用已在多种肿瘤类型中得到证实<sup>[118, 119]</sup>。在本部分的研究

中，我们构建了 RELA 和 FOS 基因的过表达和 RNA 干扰载体，分别在两株胃癌细胞中上、下调 RELA 和 FOS 的表达，功能研究结果表明上调 RELA 和 FOS 能够促进胃癌细胞生长增殖，共转染 miR-7 与 RELA 或 FOS 的野生型过表达载体可抑制 RELA 和 FOS 对胃癌细胞增殖促进作用，而突变 RELA 和 FOS 载体上的 miR-7 结合位点后，共转染 miR-7 对胃癌细胞增殖的抑制作用则被逆转。以上结果表明，在胃癌细胞中，miR-7 通过抑制转录因子 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 家族成员 RELA 和 FOS，调控胃癌生长增殖，这一发现可能是 miR-7 抑制肿瘤发生和发展的又一重要机制。

炎症通常被认为是机体对外界刺激所产生的一种保护性的免疫应答机制，近年研究表明，长期慢性炎症刺激可诱导细胞转化，促进肿瘤发生和发展<sup>[125]</sup>。在机体的天然性和获得性免疫反应中，NF- $\kappa$ B 的激活是细胞应对损伤、应激，进而产生炎症反应的一个核心分子事件，但 NF- $\kappa$ B 的组成性持续激活则可导致组织损伤和细胞恶性转化<sup>[126]</sup>。因此，NF- $\kappa$ B 激活后必须有适当负反馈机制降低或终止其活性，以维持组织微环境的稳态<sup>[127]</sup>。例如，经典的 NF- $\kappa$ B 激活后能够促进 I $\kappa$ B 蛋白编码基因的表达，后者则在细胞浆中发挥抑制 NF- $\kappa$ B 的作用<sup>[127]</sup>；另外，NF- $\kappa$ B 激活能影响细胞内泛素化酶的活性，后者能诱导 IKK 蛋白的泛素化并降解<sup>[127]</sup>。

在本部分的研究中，我们发现 miR-7 可能是细胞中负性调控 NF- $\kappa$ B 活性的重要反馈调控机制，理由如下：第一，在本文第三部分，我们已经证实 RELA 是 miR-7 的直接靶分子，本部分的功能试验也证实其是 miR-7 的功能靶分子，说明 miR-7 可通过抑制 RELA 的表达，以调控活化的 NF- $\kappa$ B 的“量”；第二，我们发现 miR-7 能够抑制 IKK $\epsilon$  的表达，后者是一条件诱导性表达的分子，被报道作为促癌基因参与了多种肿瘤的发生和发展<sup>[128]</sup>。miR-7 通过抑制 IKK $\epsilon$  的表达，抑制了 RELA 的磷酸化，以调控活化的 NF- $\kappa$ B 的“度”。因此，miR-7 可从调控 NF- $\kappa$ B 活化的“量”与“度”两个方面，综合发挥对 NF- $\kappa$ B 激活后的负性调控作用。值得指出的是，miR-7 抑制 IKK $\epsilon$  阻滞 RELA 激活可能由多种机制导致。研究表明，IKK $\epsilon$  可通过磷酸化 I $\kappa$ B，导致其降解，从而促进 RELA 磷酸化激活；也有报道 IKK $\epsilon$  可直接磷酸化 RELA，从而促进其活化<sup>[128]</sup>。因此，miR-7 通过抑制 IKK $\epsilon$  阻滞 RELA 激活可能经由 I $\kappa$ B 介导，也可能是其对 RELA 的直接作用，或二者作用兼而有之。

在本部分的研究中，我们除了观察到 miR-7 对 IKK $\epsilon$  和 RELA 的抑制外，还发现了 IKK $\epsilon$  和 RELA 对 miR-7 的转录抑制，从而形成了一个未被报道的 miR-7 与

IKK $\epsilon$ /RELA 间的双负反馈调控环路。这一双负反馈环路的提出，基于以下证据：首先，我们在胃上皮细胞 GES 中过表达 IKK $\epsilon$  和 RELA 后，miR-7 的初始转录本和成熟体表达均下降，在胃癌细胞 BGC823 中沉默 IKK $\epsilon$  和 RELA 后，miR-7 表达则上升；其次，我们在 miR-7 的 3 个编码基因的启动子区域均发现多个 NF- $\kappa$ B 结合位点，并通过 ChIP 实验证实 RELA 可与 miR-7-1 和 miR-7-2 编码基因的启动子区域相结合；再次，我们利用免疫荧光观察到上调 miR-7 后 IKK $\epsilon$  和 RELA 表达下降，且细胞核内 RELA 明显减少，而下调 miR-7 后 IKK $\epsilon$  和 RELA 表达升高，且细胞核内 RELA 明显增多，实时定量 PCR 也证实 miR-7 可影响 NF- $\kappa$ B 多个经典下游效应分子的表达。这种 miR-7 和 NF- $\kappa$ B 信号通路间的相互调控关系可解释为细胞内的一种双稳态反馈系统 (bistable system)。通过这种交互反馈抑制，环路中的每个基因能够实现对自身表达的正反馈调节，使得细胞能够在未受刺激和炎症反应两种状态间进行迅速转换，以更好地适应细胞微环境的改变。

幽门螺杆菌是定植于胃粘膜的革兰氏阴性菌，幽门螺杆菌感染是导致胃粘膜慢性炎症的重要原因。流行病学调查显示，幽门螺杆菌是引起胃癌的主要生物学因素，已被世界卫生组织列为胃癌的 I 类致癌因子<sup>[129]</sup>。幽门螺杆菌的毒力因子是菌株的重要特性，与其致病作用密切相关。细胞毒素相关基因 A (CagA) 是幽门螺杆菌的 Cag 致病岛 (Cag PAI) 中 CagA 基因的编码产物，是幽门螺杆菌感染导致宿主产生炎症反应的重要效应蛋白。根据 CagA 蛋白的表达与否，临床上一般把菌株划分为 CagA 阳性和 CagA 阴性两种<sup>[130]</sup>。研究表明，感染 CagA 阳性菌株的患者罹患胃溃疡和胃癌的风险明显高于感染 CagA 阴性菌株的患者<sup>[131]</sup>。在感染胃上皮细胞后，幽门螺杆菌通过 Cag PAI 编码的 IV 型分泌系统 (T4SS) 将 CagA 注入细胞，后者通过依赖或不依赖酪氨酸磷酸化途径与细胞内多种蛋白作用，引发级联反应，强烈干扰正常的信号转导通路<sup>[132]</sup>。胃上皮细胞中 NF- $\kappa$ B 信号转导通路的异常激活是幽门螺杆菌感染引发的胃粘膜炎症向胃癌转变过程中重要的分子生物学事件。研究表明，幽门螺杆菌感染可导致 NF- $\kappa$ B 组成性激活，并持续启动其下游效应分子 c-Myc, Cyclin D 和 Bcl-2 家族蛋白等基因的转录，引起胃上皮细胞增殖和凋亡速率的改变，破坏细胞的分化过程，最终导致细胞的恶性转化<sup>[133, 134]</sup>。在本部分的研究中，我们发现幽门螺杆菌感染能够促进胃上皮细胞中 IKK $\epsilon$  和 RELA 表达，增强 NF- $\kappa$ B 转录活性，进而抑制 miR-7 的表达水平。根据上述实验结果，我们提出这一假说：幽门螺杆菌定植胃



粘膜造成的慢性炎症可能打破了 miR-7 和 NF- $\kappa$ B 信号通路间双稳态反馈系统的平衡，导致 NF- $\kappa$ B 过度激活，并对 miR-7 的抑制占据主导地位，导致其表达减少，其抑癌功能被削减，而 NF- $\kappa$ B 的促增殖和抗凋亡等效应在 miR-7 缺失后进一步增强，这种单向正反馈最终可能导致胃上皮细胞发生恶性转化（图 4-13）。

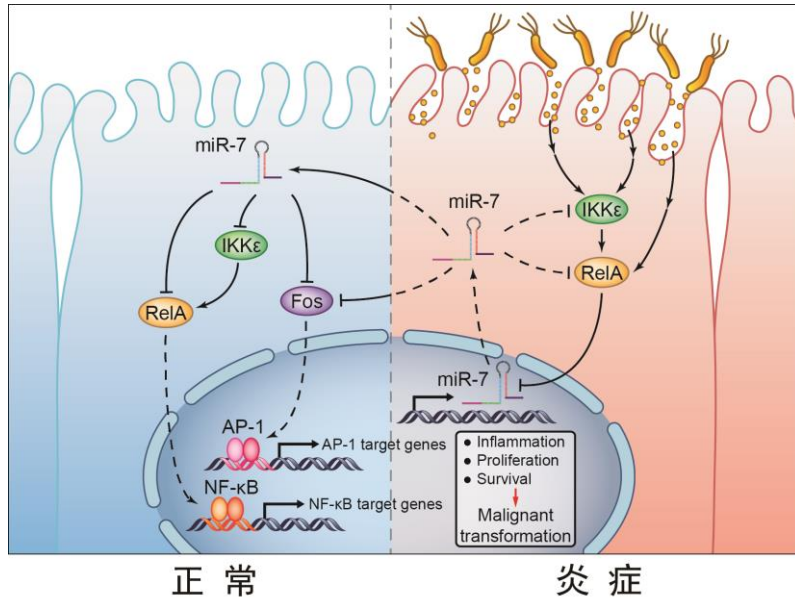


图 4-13 胃上皮细胞中的 miR-7/NF- $\kappa$ B 双负反馈环路示意图

综上，本部分的研究明确了 miR-7 通过介导抑制 RELA 和 FOS 调控胃癌细胞增殖的分子机制，揭示了 miR-7 对 RELA 调控的两种途径，阐明了 miR-7 与 NF- $\kappa$ B 间的双负反馈调控关系，并提出了幽门螺杆菌感染是打破 miR-7 与 NF- $\kappa$ B 间平衡、导致 miR-7 降低的重要原因。以上观点的提出，有利于进一步认识胃癌发生的分子机制，有助于为胃癌的临床治疗提供新的思路。

## 第五部分 miR-7 调控胃癌转移的机制研究

IGF1R 是受体酪氨酸蛋白激酶超家族的重要成员，近年来被报道参与调控了肿瘤转移过程中的多个关键步骤。据此，我们推测 miR-7 负性调控 IGF1R 可能是介导 miR-7 抑制胃癌转移功能中的重要机制。在本部分实验中，我们研究了 miR-7 对 IGF1R 的调控作用在胃癌细胞转移表型中的影响，并观察到 miR-7 在胃癌细胞 EMT 过程中的发挥的作用，初步揭示了 miR-7 通过负性调控 IGF1R/Snail 分子通路逆转胃癌细胞 EMT 的分子机制。

### 1 材料

#### 1.1 载体

基因表达和 shRNA 干扰载体采用 pcDNA3.1 质粒，双萤光素酶报告基因载体采用 psi-CHECK-2 质粒。

#### 1.2 细胞系

GES 细胞、GC9811 细胞和 GC9811-P 细胞来源同第一部分 1.1。

#### 1.2 实验动物

6-8 周龄雌性 BALB/C 裸鼠购自第四军医大学实验动物中心。

#### 1.3 组织芯片

胃癌转移组织芯片购自陕西超英生物科技有限公司。

#### 1.4 主要试剂

细胞培养基	Hyclone 公司
胎牛血清	Hyclone 公司
胰蛋白酶	Hyclone 公司
miRNeasy Mini Kit	Qiagen 公司
TaqMan MicroRNA Assay	AB 公司

TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	AB 公司
TaqMan Fast Advanced Master Mix	AB 公司
IGF1R 抗体	Abcam 公司
Snail 抗体	Santa Cruz 公司
E-cadherin 抗体	BD 公司
$\beta$ -catenin 抗体	BD 公司
Transwell 小室	Corning 公司

## 1.5 主要仪器

CO <sub>2</sub> 细胞培养箱	Thermo 公司
超净工作台	Thermo 公司
超低温冰箱	Thermo 公司
光学显微镜	Olympus 公司
台式高速离心机	Eppendorf 公司
纯水仪	Millipore 公司
共聚焦显微镜	Olympus 公司
微量紫外分光光度计	Thermo 公司
快速转膜仪	Bio-Rad 公司
普通 PCR 仪	AB 公司
实时定量 PCR 仪	Roche 公司

## 2 方法

### 2.1 过表达或沉默 IGF1R 对胃癌细胞迁移、侵袭和转移能力的影响

#### 2.1.1 构建 IGF1R 的表达载体和 siRNA/shRNA 载体

方法同第三部分 2.5.1。

#### 2.1.2 在胃癌细胞中转染 IGF1R 的表达载体和 siRNA

除转染试剂使用 Lipofectamine 2000 外，其余方法同第二部分 2.1.2。

#### 2.1.3 Western blot 检测 IGF1R 过表达和 siRNA 干扰效率

方法同第三部分 2.7。

#### 2.1.4 功能实验检测 IGF1R 对胃癌细胞迁移、侵袭和转移能力的影响

方法同第二部分 2.2.6、2.2.7 和 2.3.2。

#### 2.1.5 功能挽救实验检测 miR-7 通过调控 IGF1R 对胃癌细胞迁移、侵袭和转移能力的影响

共转染方法同第三部分 2.5.2，功能实验方法同第二部分 2.2.6、2.2.7 和 2.3.2。

### 2.2 实时定量 PCR 检测 E-cadherin 上游转录抑制因子的表达

方法同第四部分 2.4.2。

### 2.3 miR-7 对胃癌细胞 EMT 相关标志物表达的影响

#### 2.3.1 免疫荧光检测胃癌细胞 EMT 相关分子表达和定位

方法同第四部分 2.4.1。

#### 2.3.2 Western blot 检测胃癌细胞 EMT 相关分子表达

方法同第三部分 2.7。

### 2.4 IHC 检测胃癌组织芯片中 IGF1R 的表达

方法同第四部分 2.6。

## 3 结果

### 3.1 miR-7 通过调控 IGF1R 抑制胃癌细胞侵袭和转移

#### 3.1.1 构建 IGF1R 的功能获得和功能缺失细胞模型

构建包含 IGF1R 过表达载体，瞬时转染 GC9811 细胞后，利用 Western blot 检测 IGF1R 的蛋白表达，结果表明 IGF1R 的过表达载体成功上调了细胞内 IGF1R 的蛋白水平（图 5-1A）。设计并合成 IGF1R 的 siRNA，瞬时转染 GC9811-P 细胞后，利用 Western blot 检测 IGF1R 的蛋白表达，结果表明 siIGF1R#4 明显下调了细胞内 IGF1R 的蛋白水平（图 5-1B）。上述结果表明，通过转染 IGF1R 的过表达载体和 siRNA，成功构建了 IGF1R 的功能获得和功能缺失细胞模型。



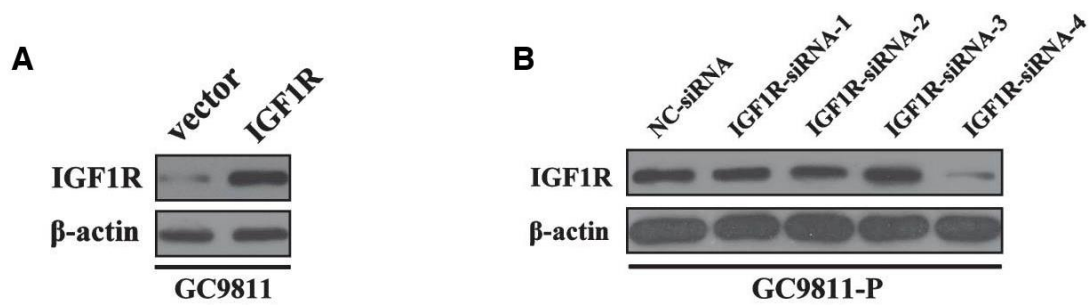


图 5-1 IGF1R 的表达载体的表达效率和 IGF1R siRNAs 的干扰效率

**A:** Western blot 验证 IGF1R 表达载体的表达效率; **B:** Western blot 验证 IGF1R siRNAs 的干扰效率。

### 3.1.2 IGF1R 促进胃癌细胞侵袭转移

在 GC9811-P 细胞中, 通过瞬时转染 IGF1R 的 siRNA, 利用 Transwell 迁移和侵袭实验检测 IGF1R 对胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响, 结果表明下调 IGF1R 后 GC9811-P 细胞的迁移和侵袭能力低于对照组 (图 5-2A)。在 GC9811 细胞中, 通过瞬时转染 IGF1R 的野生型过表达载体, 利用 Transwell 迁移和侵袭实验检测 IGF1R 对胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响, 结果表明上调 IGF1R 后 GC9811 细胞的迁移和侵袭能力高于对照组 (图 5-2B)。进一步通过转染 IGF1R 的 shRNA 干扰载体, 利用裸鼠尾静脉成瘤实验检测 IGF1R 对胃癌细胞体内转移能力的影响, 结果表明下调 IGF1R 后 GC9811-P 在肝内形成转移灶的数量明显少于对照组 (图 5-2C)。上述结果表明, IGF1R 能够促进胃癌细胞侵袭转移。

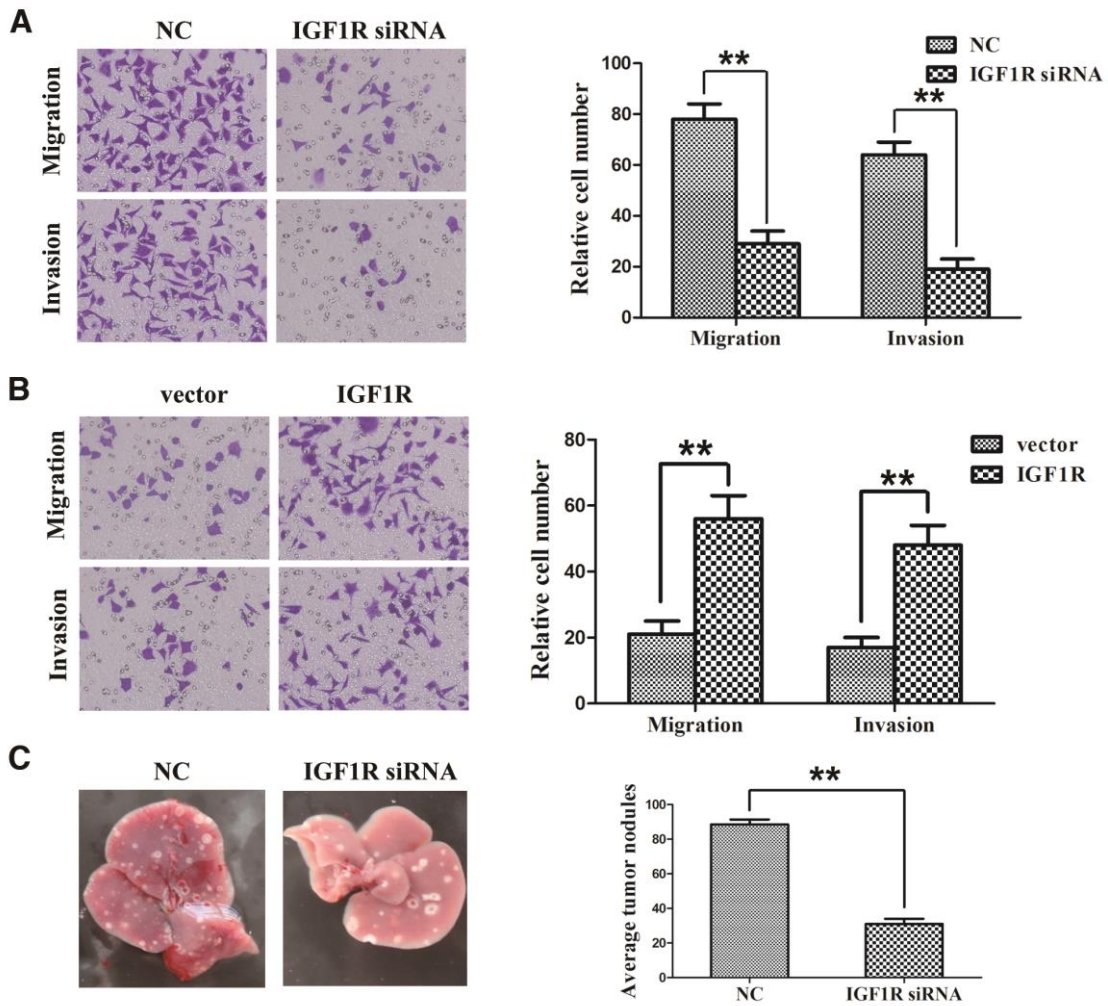


图 5-2 IGF1R 对胃癌细胞迁移、侵袭和转移能力的影响

**A:** 在 GC9811-P 细胞中干扰 IGF1R 表达对胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响；**B:** 在 GC9811 细胞中过表达 IGF1R 对胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响；**C:** 在 GC9811-P 细胞中干扰 IGF1R 表达对胃癌细胞体内转移能力的影响。

### 3.1.3 miR-7 能抑制 IGF1R 对胃癌细胞侵袭转移的促进作用

构建包含 IGF1R 蛋白编码序列和 3'-UTR 区域的过表达载体，分别命名为野生型 IGF1R（包含 IGF1R 的蛋白编码序列和野生型 3'-UTR 区域）和突变型 IGF1R（仅包含 IGF1R 的蛋白编码序列），并通过 Western blot 检测载体的表达效率（图 5-3A）。在 GC9811 细胞中，通过共转染 miR-7 和 IGF1R 的野生型和突变型过表达载体，利用 Western blot 检测 miR-7 对 IGF1R 表达的影响，结果表明上调 miR-7 能在 GC9811 细胞中抑制野生型 IGF1R 的过量表达，但不能抑制细胞中突变型 IGF1R 的表达（图 5-3B）。

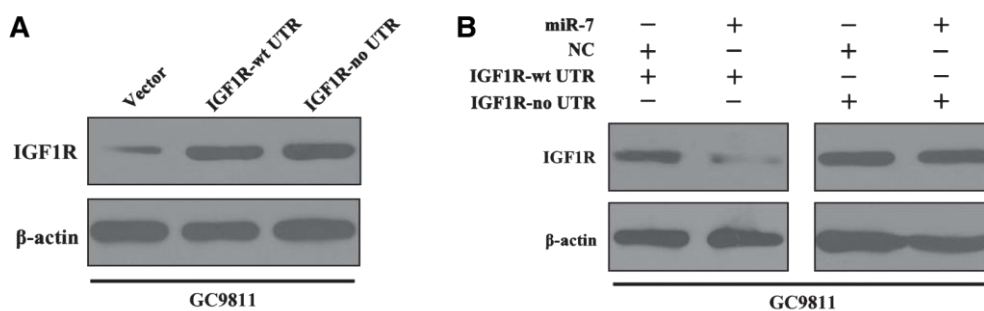


图 5-3 IGF1R 野生型和突变型过表达载体的构建与功能验证

**A:** IGF1R 野生型和突变型过表达载体的表达效率；**B:** miR-7 对 IGF1R 野生型和突变型过表达载体抑制效应的差异。

利用 Transwell 迁移和侵袭实验检测胃癌细胞的迁移和侵袭能力，结果表明：共转染 miR-7 和野生型 IGF1R 过表达载体时，GC9811 细胞的迁移和侵袭能力低于单独转染野生型 IGF1R 过表达载体组，但略高于阴性对照组（图 5-4A）。进一步利用裸鼠尾静脉成瘤实验检测共转染 miR-7 和 IGF1R 对胃癌细胞体内转移能力的影响，结果表明共转染 miR-7 和野生型 IGF1R 过表达载体时，GC9811 细胞在肝内形成转移灶的数量低于单独转染野生型 IGF1R 过表达载体组，略高于阴性对照组（图 5-4B）。上述结果表明，miR-7 能够抑制 IGF1R 过表达对胃癌细胞侵袭转移的促进作用。以上结果共同表明，miR-7 通过调控 IGF1R 抑制胃癌细胞侵袭和转移。

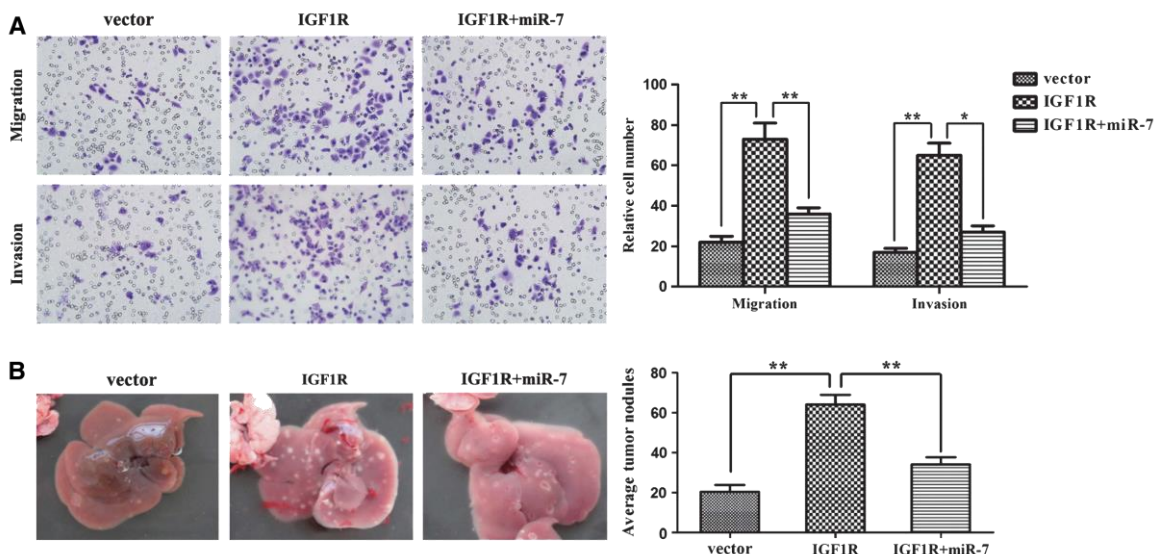


图 5-4 miR-7 抑制 IGF1R 对胃癌细胞迁移、侵袭和转移的促进作用

**A:** miR-7 抑制过表达 IGF1R 对胃癌细胞体外迁移和侵袭的促进作用；**B:** miR-7 抑制过表达 IGF1R 对胃癌细胞体内转移的促进作用。

### 3.2 miR-7 抑制胃癌细胞 EMT

使用 miR-7 mimic 及其阴性对照瞬时转染 GC9811-P 细胞后, 显微镜下观察细胞形态变化, 发现与对照组相比, 上调 miR-7 后的 GC9811-P 细胞间接触更为紧密 (图 5-5A)。使用 miR-7 mimic 和 miR-7 inhibitor 及其阴性对照, 分别瞬时转染 GC9811-P 和 GES 细胞, 利用 Western blot 检测 miR-7 对细胞中上皮和间质相关标志物的影响, 结果表明: 上调 miR-7 后 GC9811-P 细胞中上皮标志物 E-cadherin 和  $\beta$ -catenin 表达升高, 间质标志物 vimentin 表达降低; 下调 miR-7 后 GES 细胞中上皮标志物 E-cadherin 和  $\beta$ -catenin 表达降低, 间质标志物 vimentin 表达升高 (图 5-5B)。进一步利用间接免疫荧光染色方法, 检测 miR-7 对 GC9811-P 细胞中上皮和间质相关标志物的影响, 结果表明: 上调 miR-7 后 GC9811-P 细胞中 E-cadherin 表达升高, vimentin 表达降低; 且 GC9811-P 细胞中的  $\beta$ -catenin 核转位现象明显减少 (图 5-5C)。上述实验表明, miR-7 抑制胃癌细胞的 EMT 过程。

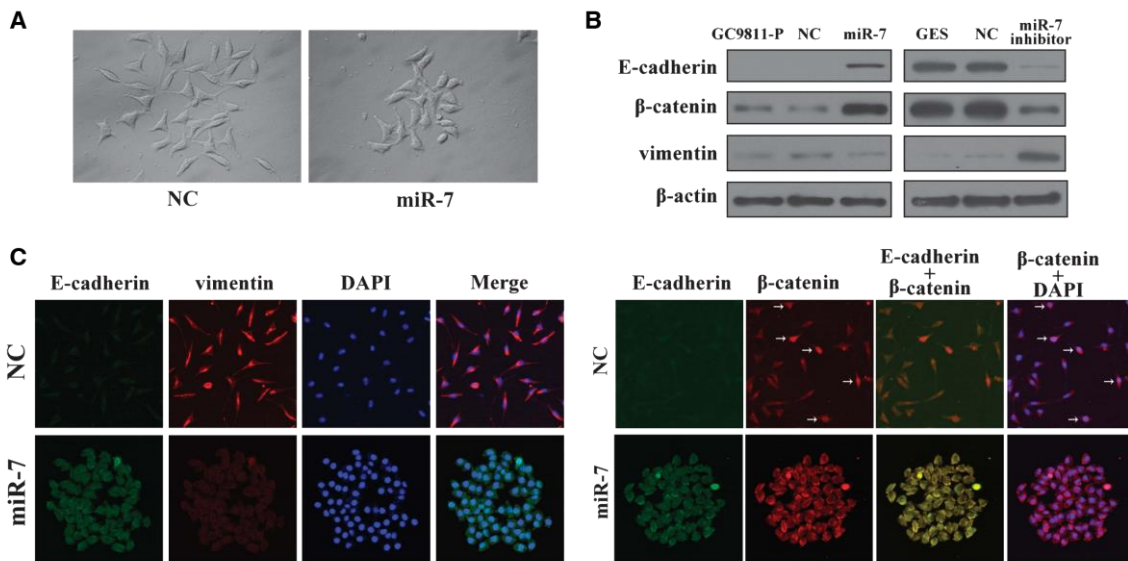


图 5-5 miR-7 抑制胃癌细胞 EMT

**A:** 过表达 miR-7 对胃癌细胞形态特征的影响; **B:** 上下调 miR-7 对 EMT 相关标志物表达水平的影响; **C:** 上调 miR-7 对 EMT 相关标志物表达水平和细胞分布的影响。

### 3.3 miR-7 通过抑制 IGF1R/Snail 分子通路促进 E-cadherin 表达

使用 miR-7 mimic 及其阴性对照瞬时转染 GC9811-P 细胞后, 利用实时定量 PCR 方法检测 miR-7 对调控 E-cadherin 的转录抑制因子 Snail、Slug、ZEB1 和 ZEB2 基因



mRNA 表达的影响。结果表明,与对照组相比,上调 miR-7 能显著抑制 Snail 的表达,而其他基因的表达无明显改变(图 5-6A)。在 GC9811 细胞中,通过共转染 miR-7 和 IGF1R 的野生型或突变型过表达载体,利用 Western blot 检测 IGF1R、Snail 和 E-cadherin 的蛋白表达变化。结果表明:共转染 miR-7 和野生型 IGF1R 载体后,GC9811 细胞中 IGF1R 和 Snail 蛋白表达较单独转染野生型 IGF1R 载体组下降,E-cadherin 表达上升;但共转染 miR-7 和突变型 IGF1R 载体后,GC9811 细胞中 IGF1R、Snail 和 E-cadherin 的蛋白表达未发生明显变化(图 5-6B)。上述结果表明,miR-7 通过负性调控 IGF1R 表达,介导对 Snail 的抑制,从而解除后者对 E-cadherin 的转录抑制,进而促进 E-cadherin 的表达。

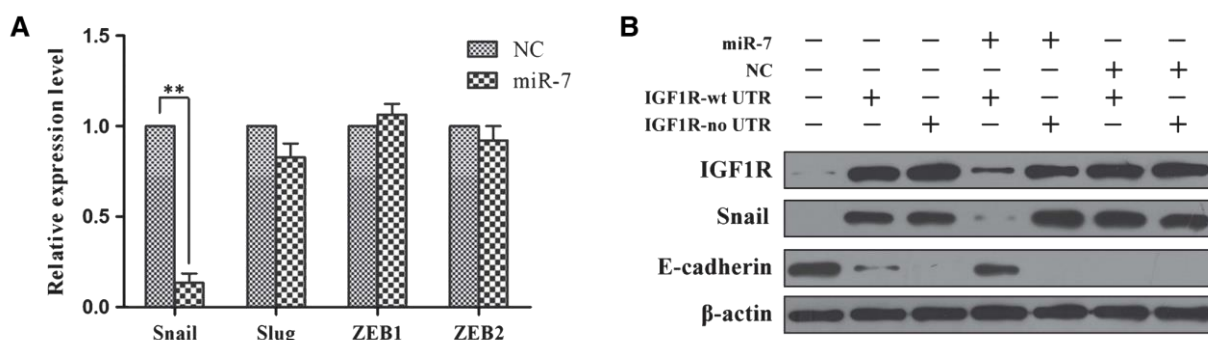


图 5-6 miR-7 通过抑制 IGF1R/Snail 通路促进 E-cadherin 表达

**A:** miR-7 对 E-cadherin 的转录抑制因子 Snail、Slug、ZEB1 和 ZEB2 基因表达的影响; **B:** miR-7 通过抑制 IGF1R 发挥对 Snail 和 E-cadherin 的调控作用。

### 3.4 miR-7 与 IGF1R 在胃癌组织中表达水平呈负相关

使用胃癌转移组织芯片,利用 ISH 和 IHC 方法检测分别组织芯片中 miR-7 和 IGF1R 的表达。结果表明:miR-7 在胃癌转移灶中的表达低于原发灶,IGF1R 在胃癌转移灶中的表达则高于原发灶(图 5-7;表 5-1、表 5-2);结合本文第一部分利用同一组织芯片检测 miR-7 表达的结果,通过相关性分析表明,miR-7 与 IGF1R 在胃癌组织中的表达呈负相关(表 5-3)。

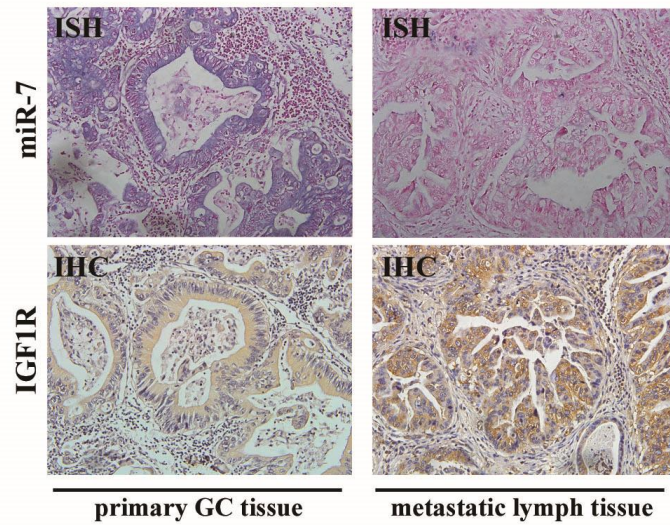


图 5-7 IGF1R 在胃癌原发灶和转移灶中的表达

表 5-1 miR-7 在 40 对胃癌原发组织和转移淋巴组织中的表达

	miR-7 Expression Level				P value
	Negative(-)	Weak(+)	Moderate(++)	Strong(+++)	
GC	4/40(10%)	12/40(30%)	19/40(47.5%)	5/40(12.5%)	<0.05
Metastasis	27/40(67.5%)	9/40(22.5%)	3/40(7.5%)	1/40(2.5%)	

表 5-2 IGF1R 在 40 对胃癌原发组织和转移淋巴组织中的表达

	IGF1R Expression Level				P value
	Negative(-)	Weak(+)	Moderate(++)	Strong(+++)	
GC	9/40(22.5%)	21/40(52.5%)	8/40(20%)	3/40(7.5%)	<0.05
Metastasis	2/40(5%)	5/40(12.5%)	10/40(25%)	23/40(57.5%)	

表 5-3 miR-7 和 IGF1R 在 40 对胃癌组织中表达的相关性

IGF1R	miR-7				n	P	Spearman's correlation	
	Negative	Weak	Moderate	Strong			P	r
Negative	0	2	6	2	80	<0.05	<0.01	-0.6786
Weak	4	4	14	4				
Moderate	9	7	2	0				
Strong	18	8	0	0				

## 4 讨论

转移 (Metastasis) 是指恶性肿瘤细胞从原发部位经淋巴、血液、体腔等途径播散到其他部位的过程, 是恶性肿瘤的基本特征<sup>[135]</sup>。在胃癌中, 转移是导致肿瘤复发和患者死亡的主要原因之一。流行病学资料显示, 大多数胃癌患者因治愈率低、肿瘤细胞易于浸润和迁移而诱发远处转移, 最终导致机体多器官功能衰竭而死亡<sup>[136]</sup>。肿瘤转移的发生是一个多因素、多步骤复杂过程, 可大致划分为三个阶段: 首先, 肿瘤原发灶中部分细胞的运动和迁移能力增强, 与周围细胞脱粘附后, 分泌多种蛋白分解酶来溶解周围组织, 侵入细胞外基质; 其次, 肿瘤细胞穿入血管或淋巴管, 在循环系统中逃避免疫系统攻击并存活; 最后, 肿瘤细胞穿出血管, 在远端器官的定植并增殖, 最终形成转移灶<sup>[137]</sup>。

肿瘤转移过程中常伴随着多种基因和信号通路的改变。IGF1R 是调控肿瘤生长的重要基因。近年研究表明, IGF1R 在细胞恶性转化和肿瘤浸润、转移方面也发挥着重要作用<sup>[138]</sup>。Dunn 等在雌激素受体阴性的两株乳腺癌细胞系 MDA-MB-435 和 MDA-MB-231 中发现, 通过表达 IGF1R 显性负性突变体, 能够显著抑制细胞的粘附和侵袭能力<sup>[139]</sup>。Reinmuth 等在结肠癌细胞系 HT29 中转染 IGF1R 的显性负性突变体, 通过体外和体内功能研究表明, IGF1R 能够促进肿瘤转移, 且这一功能并不依赖于其对肿瘤生长的促进作用<sup>[140]</sup>。在本部分的研究中, 首先, 我们通过构建 IGF1R 的过表达和 RNA 干扰载体, 在 GC9811 和 GC9811-P 细胞中分别上调和下调 IGF1R 的表达, 利用体外和体内功能研究, 证实了 IGF1R 能够促进胃癌细胞侵袭和转移。其次, 我们通过共转染 miR-7 和 IGF1R, 通过功能挽救实验, 证实了 miR-7 通过靶向 IGF1R 抑制胃癌转移, 明确了 IGF1R 是 miR-7 的直接功能靶分子。再次, 我们在胃癌组织芯片中观察到 miR-7 与 IGF1R 表达呈负相关, 进一步提示 miR-7 对 IGF1R 的调控具有重要的临床意义。

EMT 是指上皮型细胞在特定生理或病理条件下向间质型细胞表型转变的过程。根据参与生物学过程的不同, EMT 可划分为三类: (1) 胚胎形成和器官发育相关的 EMT; (2) 创伤修复和器官纤维化相关的 EMT; (3) 肿瘤相关的 EMT。一般认为, 肿瘤相关的 EMT 发生在肿瘤转移的起始阶段。一方面, EMT 抑制上皮细胞的分子标志 E-cadherin、Claudin 和 Occludin 等分子的表达, 并促进间质细胞分子标志

Vimentin、N-cadherin 和 O-cadherin 等分子的表达，从而破坏细胞极性；另一方面，EMT 能够促进肿瘤细胞中基质金属蛋白酶等基因表达，从而破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障，有利于细胞从原发灶肿瘤细胞间分离脱落，发生侵袭转移<sup>[141]</sup>。研究表明，多种 miRNA 参与调控了肿瘤相关的 EMT。根据 miRNA 靶分子在 EMT 中的功能，我们把 miRNA 对 EMT 的调控作用归纳为：（1）对 EMT 诱导分子的调控：miR-30、miR-133 和 miR-590 可抑制 TGF- $\beta$ R 的表达，miR-21、miR-23b、miR-146a 和 miR-200 可抑制 Smads 的表达，以上 miRNA 能在肿瘤细胞中抑制 TGF- $\beta$  信号转导途径激活所引起的 EMT；（2）对 EMT 调控分子的调控：miR-205 和 miR-200 家族成员可抑制 ZEB1 和 ZEB2 表达，miR-30a 和 miR-203 可抑制 Snail 表达，miR-10b 和 miR-214 可抑制 Twist 的表达，以上 miRNA 能在肿瘤细胞中通过转录后抑制 E-cadherin 的转录抑制因子的表达，负性调控 EMT；（3）对 EMT 效应分子的调控：miR-9、miR-10b、miR-23b 和 miR-194 能够抑制 E-cadherin 表达，从而直接促进 EMT 的发生<sup>[142]</sup>。在本部分的研究中，我们发现 miR-7 能够抑制胃癌细胞的 EMT，有两方面证据支持我们的结论：第一，我们观察到上调 miR-7 可导致 GC9811-P 细胞形态学上的改变，并抑制其运动能力；第二，Western blot 和免疫荧光实验均证实上调 miR-7 后 GC9811-P 细胞的上皮标志 E-cadherin 明显上升。以上证据表明，miR-7 在调控胃癌转移过程中可能抑制了 EMT。

E-cadherin 表达缺失是 EMT 中的核心分子事件。研究表明，E-cadherin 的缺失可能是由于一些具有碱性螺旋-环-螺旋（basic helix loop helix）结构域的转录因子抑制其转录导致<sup>[143]</sup>。研究表明，转录因子 Snail 对 E-cadherin 具有较强的抑制作用，并诱导 EMT 的发生<sup>[144, 145]</sup>。此外，有证据显示细胞外信号，包括细胞外基质和某些生长因子，能够促进 EMT<sup>[141, 146]</sup>。在本部分的研究中，我们发现转染 miR-7 能够抑制 GC9811-P 细胞中 Snail 的表达，提示 miR-7 对 EMT 调控分子具有抑制效应。Kim 等在乳腺上皮细胞 MCF10A 中发现 IGF1R 能够促进 Snail 表达<sup>[147]</sup>，提示 IGF1R 与 Snail 的相互作用可能与 EMT 发生密切相关。我们通过 GES 细胞中转染野生型和突变型的 IGF1R 过表达载体，观察到转染 IGF1R 后胃上皮细胞中 Snail 表达升高，E-cadherin 表达降低，提示 IGF1R 可能是通过促进 Snail 抑制 E-cadherin 的表达。我们还观察到，共转染 miR-7 和野生型 IGF1R 载体在抑制 IGF1R 表达的同时，也抑制了 Snail 表达，使得 E-cadherin 表达得到部分恢复。然而，在共转染 miR-7 和突变型



IGF1R 载体时,这一 miR-7 对 IGF1R 和 Snail 的抑制以及对 E-cadherin 的促进效应随即消失。根据上述实验结果,我们提出:miR-7 对 Snail 的抑制和对 E-cadherin 的促进以及对 EMT 的调控是由 IGF1R 所介导,这一 miR-7/IGF1R/Snail 分子通路可能在胃癌早期调控 E-cadherin 表达和 EMT 中发挥重要作用(图 5-8)。

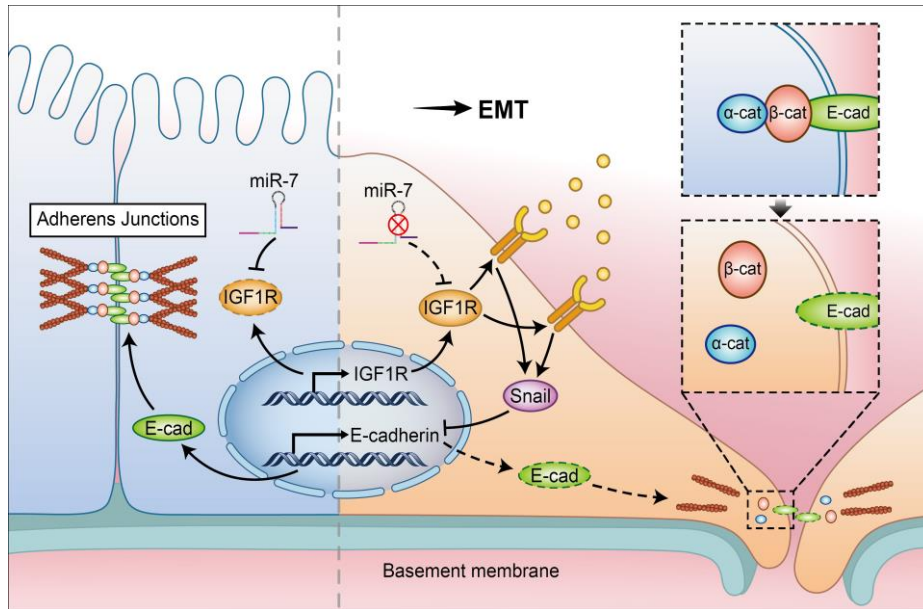


图 5-8 胃癌细胞中的 miR-7/IGF1R/Snail 分子通路示意图

正常状态下(左),胃上皮细胞中 miR-7 表达水平较高,并抑制细胞内 IGF1R 的表达;此时, E-cadherin 表达正常,粘附连接结构(Adherens Junctions)得以维持细胞的上皮表型。当细胞恶性转化后(右),miR-7 表达水平持续降低,其对 IGF1R 的抑制解除,后者在胞膜定位表达,并促进 Snail 表达;Snail 表达的增多可抑制 E-cadherin 转录,使得 Adherens Junctions 解聚,最终导致细胞发生 EMT。

## 小 结

### 一、明确了 miR-7 在胃癌中的表达模式和抑癌功能

本研究通过检测胃癌细胞系、临床组织标本和组织芯片中 miR-7 的表达水平，明确了 miR-7 表达随胃癌恶性程度增加而降低的表达模式；构建了 miR-7 的功能获得和功能缺失细胞模型，通过体内外功能实验，明确了 miR-7 对胃癌细胞增殖、凋亡和转移等恶性表型的功能影响。

### 二、利用多组学联合的高通量筛选策略寻找 miR-7 的靶分子

本研究通过联合基因芯片、蛋白组学 iTRAQ 技术等组学方法，结合生物信息学预测方法，在全基因组 mRNA 和蛋白水平高通量筛选出 miR-7 在胃癌细胞中的候选靶分子，并进一步证实了 miR-7 在胃癌细胞中对其中 RELA、FOS 和 IGF1R 的直接调控作用。

### 三、提出并证实 miR-7/IKK $\epsilon$ /RELA 双负反馈环路调控胃癌发生的分子机制

本研究发现 miR-7 在胃癌细胞中除可直接抑制 RELA 表达外，还可以通过抑制 IKK $\epsilon$  间接降低 RELA 的磷酸化水平；另一方面，过表达 IKK $\epsilon$  和 RELA 可抑制胃上皮细胞内 miR-7 的表达，且 RELA 能直接结合至 miR-7 的启动子区域，表明 miR-7 与 IKK $\epsilon$  和 RELA (NF- $\kappa$ B 信号通路) 间存在双负反馈调控关系；进一步研究发现，幽门螺杆菌感染可在促进 IKK $\epsilon$  和 RELA 表达的同时抑制 miR-7 表达，由此推测幽门螺杆菌感染可能是打破 miR-7/IKK $\epsilon$ /RELA 双负反馈平衡的始动因素之一。

### 四、提出并证实 miR-7/IGF1R/Snail/E-cadherin 通路调控胃癌 EMT 的分子途径

本研究发现 miR-7 在胃癌细胞中可通过负性调控 IGF1R 抑制胃癌细胞转移，同时还发现 miR-7 可抑制胃癌细胞的 EMT 过程；miR-7 可通过抑制 IGF1R，间接降低 Snail 的表达水平，从而解除了后者对上皮表型的关键维持分子 E-cadherin 的抑制；这一 miR-7/IGF1R/Snail/E-cadherin 分子通路可能在胃癌早期发挥抑制细胞发生 EMT 和侵袭转移的作用。

## 参考文献

- [1] Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*,1993,75(5):843-854.
- [2] Wightman B., Ha I., Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*[J]. *Cell*,1993,75(5):855-862.
- [3] Pasquinelli A. E., Reinhart B. J., Slack F., et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA[J]. *Nature*,2000,408(6808):86-89.
- [4] Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data[J]. *Nucleic Acids Res*,2014,42(Database issue):D68-D73.
- [5] Bartel D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*,2004,116(2):281-297.
- [6] Lau N. C., Lim L. P., Weinstein E. G., et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Science*,2001,294(5543):858-862.
- [7] Aravin A. A., Lagos-Quintana M., Yalcin A., et al. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development[J]. *Dev Cell*,2003,5(2):337-350.
- [8] Lim L. P., Glasner M. E., Yekta S., et al. Vertebrate microRNA genes[J]. *Science*,2003,299(5612):1540.
- [9] Roush S., Slack F. J. The *let-7* family of microRNAs[J]. *Trends Cell Biol*,2008,18(10):505-516.
- [10] Krichevsky A. M., King K. S., Donahue C. P., et al. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development[J]. *RNA*,2003,9(10):1274-1281.
- [11] Miska E. A., Alvarez-Saavedra E., Townsend M., et al. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain[J]. *Genome Biol*,2004,5(9):R68.
- [12] Babak T., Zhang W., Morris Q., et al. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference[J]. *RNA*,2004,10(11):1813-1819.
- [13] Liang Y., Ridzon D., Wong L., et al. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues[J]. *BMC Genomics*,2007,8:166.
- [14] Fujita S., Ito T., Mizutani T., et al. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism[J]. *J Mol Biol*,2008,378(3):492-504.
- [15] Oszolak F., Poling L. L., Wang Z., et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters[J]. *Genes Dev*,2008,22(22):3172-3183.
- [16] Gruber J. J., Zatechka D. S., Sabin L. R., et al. *Ars2* links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation[J]. *Cell*,2009,138(2):328-339.
- [17] Saini H. K., Griffiths-Jones S., Enright A. J. Genomic analysis of human microRNA

- transcripts[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2007,104(45):17719-17724.
- [18] Mahony S., Corcoran D. L., Feingold E., et al. Regulatory conservation of protein coding and microRNA genes in vertebrates: lessons from the opossum genome[J]. *Genome Biol*,2007,8(5):R84.
- [19] Han J., Pedersen J. S., Kwon S. C., et al. Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8[J]. *Cell*,2009,136(1):75-84.
- [20] Fukuda T., Yamagata K., Fujiyama S., et al. DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs[J]. *Nat Cell Biol*,2007,9(5):604-611.
- [21] Suzuki H. I., Yamagata K., Sugimoto K., et al. Modulation of microRNA processing by p53[J]. *Nature*,2009,460(7254):529-533.
- [22] Ruby J. G., Jan C. H., Bartel D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing[J]. *Nature*,2007,448(7149):83-86.
- [23] Ender C., Krek A., Friedlander M. R., et al. A human snoRNA with microRNA-like functions[J]. *Mol Cell*,2008,32(4):519-528.
- [24] Lee E. J., Baek M., Gusev Y., et al. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors[J]. *RNA*,2008,14(1):35-42.
- [25] Okamura K., Phillips M. D., Tyler D. M., et al. The regulatory activity of microRNA\* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution[J]. *Nat Struct Mol Biol*,2008,15(4):354-363.
- [26] Cheloufi S., Dos S. C., Chong M. M., et al. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis[J]. *Nature*,2010,465(7298):584-589.
- [27] Cifuentes D., Xue H., Taylor D. W., et al. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity[J]. *Science*,2010,328(5986):1694-1698.
- [28] Pillai R. S., Bhattacharyya S. N., Artus C. G., et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells[J]. *Science*,2005,309(5740):1573-1576.
- [29] Mathonnet G., Fabian M. R., Svitkin Y. V., et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F[J]. *Science*,2007,317(5845):1764-1767.
- [30] Kiriakidou M., Tan G. S., Lamprinaki S., et al. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation[J]. *Cell*,2007,129(6):1141-1151.
- [31] Wakiyama M., Takimoto K., Ohara O., et al. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system[J]. *Genes Dev*,2007,21(15):1857-1862.
- [32] Petersen C. P., Bordeleau M. E., Pelletier J., et al. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells[J]. *Mol Cell*,2006,21(4):533-542.
- [33] Nottrott S., Simard M. J., Richter J. D. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes[J]. *Nat Struct Mol Biol*,2006,13(12):1108-1114.

- [34] Wu L., Fan J., Belasco J. G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2006,103(11):4034-4039.
- [35] Giraldez A. J., Mishima Y., Rihel J., et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs[J]. *Science*,2006,312(5770):75-79.
- [36] Liu J., Valencia-Sanchez M. A., Hannon G. J., et al. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies[J]. *Nat Cell Biol*,2005,7(7):719-723.
- [37] Sen G. L., Blau H. M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies[J]. *Nat Cell Biol*,2005,7(6):633-636.
- [38] Vasudevan S., Tong Y., Steitz J. A. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation[J]. *Cell Cycle*,2008,7(11):1545-1549.
- [39] Vasudevan S., Tong Y., Steitz J. A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation[J]. *Science*,2007,318(5858):1931-1934.
- [40] Orom U. A., Nielsen F. C., Lund A. H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation[J]. *Mol Cell*,2008,30(4):460-471.
- [41] Lewis B. P., Burge C. B., Bartel D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. *Cell*,2005,120(1):15-20.
- [42] Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs[J]. *Science*,2008,319(5871):1785-1786.
- [43] Bhattacharyya S. N., Habermacher R., Martiny-Bar C., et al. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress[J]. *Cell*,2006,125(6):1111-1124.
- [44] Kedde M., Strasser M. J., Boldajipour B., et al. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA[J]. *Cell*,2007,131(7):1273-1286.
- [45] Henry N. L., Hayes D. F. Cancer biomarkers[J]. *Mol Oncol*,2012,6(2):140-146.
- [46] Calin G. A., Sevignani C., Dumitru C. D., et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2004,101(9):2999-3004.
- [47] Volinia S., Calin G. A., Liu C. G., et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2006,103(7):2257-2261.
- [48] Zhang L., Huang J., Yang N., et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2006,103(24):9136-9141.
- [49] Calin G. A., Croce C. M. MicroRNA signatures in human cancers[J]. *Nat Rev Cancer*,2006,6(11):857-866.
- [50] Krichevsky A. M., Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA[J]. *J Cell Mol Med*,2009,13(1):39-53.
- [51] Johnson S. M., Grosshans H., Shingara J., et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family[J]. *Cell*,2005,120(5):635-647.
- [52] Hurst D. R., Edmonds M. D., Welch D. R. Metastamir: the field of metastasis-regulatory

- microRNA is spreading[J]. *Cancer Res*,2009,69(19):7495-7498.
- [53] Maitra A., Hruban R. H. Pancreatic cancer[J]. *Annu Rev Pathol*,2008,3:157-188.
- [54] Sempere L. F., Christensen M., Silahtaroglu A., et al. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer[J]. *Cancer Res*,2007,67(24):11612-11620.
- [55] Rosenfeld N., Aharonov R., Meiri E., et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin[J]. *Nat Biotechnol*,2008,26(4):462-469.
- [56] Chen X., Ba Y., Ma L., et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases[J]. *Cell Res*,2008,18(10):997-1006.
- [57] Malumbres R., Sarosiek K. A., Cubedo E., et al. Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas[J]. *Blood*,2009,113(16):3754-3764.
- [58] Xi Y., Nakajima G., Gavin E., et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples[J]. *RNA*,2007,13(10):1668-1674.
- [59] Mitchell P. S., Parkin R. K., Kroh E. M., et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2008,105(30):10513-10518.
- [60] Lin J., Li J., Huang B., et al. Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis[J]. *ScientificWorldJournal*,2015,2015:657086.
- [61] Yu S. L., Chen H. Y., Chang G. C., et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer[J]. *Cancer Cell*,2008,13(1):48-57.
- [62] Yanaihara N., Caplen N., Bowman E., et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis[J]. *Cancer Cell*,2006,9(3):189-198.
- [63] Markou A., Tsaroucha E. G., Kaklamanis L., et al. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR[J]. *Clin Chem*,2008,54(10):1696-1704.
- [64] Lee J. H., Voortman J., Dingemans A. M., et al. MicroRNA expression and clinical outcome of small cell lung cancer[J]. *PLoS One*,2011,6(6):e21300.
- [65] Tavazoie S. F., Alarcon C., Oskarsson T., et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. *Nature*,2008,451(7175):147-152.
- [66] Li X., Zhang Y., Zhang Y., et al. Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature[J]. *Gut*,2010,59(5):579-585.
- [67] Karube Y., Tanaka H., Osada H., et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients[J]. *Cancer Sci*,2005,96(2):111-115.
- [68] Merritt W. M., Lin Y. G., Han L. Y., et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer[J]. *N Engl J Med*,2008,359(25):2641-2650.
- [69] Bandres E., Agirre X., Bitarte N., et al. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*,2009,125(11):2737-2743.

- [70] Weiler J., Hunziker J., Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease?[J]. *Gene Ther*,2006,13(6):496-502.
- [71] Grunweller A., Hartmann R. K. Locked nucleic acid oligonucleotides: the next generation of antisense agents?[J]. *BioDrugs*,2007,21(4):235-243.
- [72] Liu X., Sempere L. F., Ouyang H., et al. MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors[J]. *J Clin Invest*,2010,120(4):1298-1309.
- [73] Lanford R. E., Hildebrandt-Eriksen E. S., Petri A., et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection[J]. *Science*,2010,327(5962):198-201.
- [74] Gumireddy K., Young D. D., Xiong X., et al. Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*,2008,47(39):7482-7484.
- [75] Trang P., Wiggins J. F., Daige C. L., et al. Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice[J]. *Mol Ther*,2011,19(6):1116-1122.
- [76] Kumar M. S., Erkeland S. J., Pester R. E., et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2008,105(10):3903-3908.
- [77] Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. *Science*,2001,294(5543):853-858.
- [78] Gu D. N., Huang Q., Tian L. The molecular mechanisms and therapeutic potential of microRNA-7 in cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*,2014:1-12.
- [79] Choudhury N. R., de Lima A. F., de Andres-Aguayo L., et al. Tissue-specific control of brain-enriched miR-7 biogenesis[J]. *Genes Dev*,2013,27(1):24-38.
- [80] Kalinowski F. C., Brown R. A., Ganda C., et al. microRNA-7: a tumor suppressor miRNA with therapeutic potential[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2014,54:312-317.
- [81] Kefas B., Godlewski J., Comeau L., et al. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma[J]. *Cancer Res*,2008,68(10):3566-3572.
- [82] Reddy S. D., Ohshiro K., Rayala S. K., et al. MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions[J]. *Cancer Res*,2008,68(20):8195-8200.
- [83] Jiang L., Liu X., Chen Z., et al. MicroRNA-7 targets IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) in tongue squamous cell carcinoma cells[J]. *Biochem J*,2010,432(1):199-205.
- [84] Xiong S., Zheng Y., Jiang P., et al. MicroRNA-7 inhibits the growth of human non-small cell lung cancer A549 cells through targeting BCL-2[J]. *Int J Biol Sci*,2011,7(6):805-814.
- [85] Fang Y., Xue J. L., Shen Q., et al. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2012,55(6):1852-1862.

- [86] Giles K. M., Brown R. A., Epis M. R., et al. miRNA-7-5p inhibits melanoma cell migration and invasion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2013,430(2):706-710.
- [87] Liu S., Zhang P., Chen Z., et al. MicroRNA-7 downregulates XIAP expression to suppress cell growth and promote apoptosis in cervical cancer cells[J]. *FEBS Lett*,2013,587(14):2247-2253.
- [88] Zhang N., Li X., Wu C. W., et al. microRNA-7 is a novel inhibitor of YY1 contributing to colorectal tumorigenesis[J]. *Oncogene*,2013,32(42):5078-5088.
- [89] Chou Y. T., Lin H. H., Lien Y. C., et al. EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF[J]. *Cancer Res*,2010,70(21):8822-8831.
- [90] Yu Z., Ni L., Chen D., et al. Identification of miR-7 as an oncogene in renal cell carcinoma[J]. *J Mol Histol*,2013,44(6):669-677.
- [91] Wu X. M., Shao X. Q., Meng X. X., et al. Genome-wide analysis of microRNA and mRNA expression signatures in hydroxycamptothecin-resistant gastric cancer cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*,2011,32(2):259-269.
- [92] Cortes-Sempere M., Ibanez D. C. I. microRNAs as novel epigenetic biomarkers for human cancer[J]. *Clin Transl Oncol*,2011,13(6):357-362.
- [93] Webster R. J., Giles K. M., Price K. J., et al. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7[J]. *J Biol Chem*,2009,284(9):5731-5741.
- [94] Rai K., Takigawa N., Ito S., et al. Liposomal delivery of MicroRNA-7-expressing plasmid overcomes epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistance in lung cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*,2011,10(9):1720-1727.
- [95] Saydam O., Senol O., Wurdinger T., et al. miRNA-7 attenuation in Schwannoma tumors stimulates growth by upregulating three oncogenic signaling pathways[J]. *Cancer Res*,2011,71(3):852-861.
- [96] Kalinowski F. C., Giles K. M., Candy P. A., et al. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling and erlotinib sensitivity in head and neck cancer cells by miR-7[J]. *PLoS One*,2012,7(10):e47067.
- [97] Zhang X., Hu S., Zhang X., et al. MicroRNA-7 arrests cell cycle in G1 phase by directly targeting CCNE1 in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2014,443(3):1078-1084.
- [98] Wu D. G., Wang Y. Y., Fan L. G., et al. MicroRNA-7 regulates glioblastoma cell invasion via targeting focal adhesion kinase expression[J]. *Chin Med J (Engl)*,2011,124(17):2616-2621.
- [99] Kong X., Li G., Yuan Y., et al. MicroRNA-7 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer cells via targeting FAK expression[J]. *PLoS One*,2012,7(8):e41523.
- [100] Okuda H., Xing F., Pandey P. R., et al. miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4[J]. *Cancer Res*,2013,73(4):1434-1444.
- [101] Wang W., Dai L. X., Zhang S., et al. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by



- plasmid-based microRNA-7 inhibits human malignant gliomas growth and metastasis in vivo[J]. *Neoplasma*,2013,60(3):274-283.
- [102] Pogribny I. P., Filkowski J. N., Tryndyak V. P., et al. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin[J]. *Int J Cancer*,2010,127(8):1785-1794.
- [103] Foekens J. A., Sieuwerts A. M., Smid M., et al. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2008,105(35):13021-13026.
- [104] Veerla S., Lindgren D., Kvist A., et al. MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31[J]. *Int J Cancer*,2009,124(9):2236-2242.
- [105] Rao Q., Shen Q., Zhou H., et al. Aberrant microRNA expression in human cervical carcinomas[J]. *Med Oncol*,2012,29(2):1242-1248.
- [106] Cheng A. M., Byrom M. W., Shelton J., et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis[J]. *Nucleic Acids Res*,2005,33(4):1290-1297.
- [107] Xie J., Chen M., Zhou J., et al. miR-7 inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer cells by suppressing epidermal growth factor receptor expression[J]. *Oncol Rep*,2014,31(4): 1715-1722.
- [108] Thomas M., Lieberman J., Lal A. Desperately seeking microRNA targets[J]. *Nat Struct Mol Biol*,2010,17(10):1169-1174.
- [109] John B., Enright A. J., Aravin A., et al. Human MicroRNA targets[J]. *PLoS Biol*,2004,2(11): e363.
- [110] Friedman R. C., Farh K. K., Burge C. B., et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. *Genome Res*,2009,19(1):92-105.
- [111] Krek A., Grun D., Poy M. N., et al. Combinatorial microRNA target predictions[J]. *Nat Genet*,2005,37(5):495-500.
- [112] Sethupathy P., Megraw M., Hatzigeorgiou A. G. A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets[J]. *Nat Methods*,2006,3(11): 881-886.
- [113] Johnson C. D., Esquela-Kerscher A., Stefani G., et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells[J]. *Cancer Res*,2007,67(16):7713-7722.
- [114] Frankel L. B., Christoffersen N. R., Jacobsen A., et al. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*,2008,283(2):1026-1033.
- [115] Leivonen S. K., Rokka A., Ostling P., et al. Identification of miR-193b targets in breast cancer cells and systems biological analysis of their functional impact[J]. *Mol Cell Proteomics*,2011,

- 10(7):M110-M5322.
- [116] Yang Y., Chaerkady R., Beer M. A., et al. Identification of miR-21 targets in breast cancer cells using a quantitative proteomic approach[J]. *Proteomics*,2009,9(5):1374-1384.
- [117] Wang G. K., Zhang W. The signaling network of tumor invasion[J]. *Histol Histopathol*, 2005,20(2):593-602.
- [118] Eferl R., Wagner E. F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis[J]. *Nat Rev Cancer*,2003,3(11):859-868.
- [119] Quante M., Varga J., Wang T. C., et al. The gastrointestinal tumor microenvironment[J]. *Gastroenterology*,2013,145(1):63-78.
- [120] Vaquerizas J. M., Kummerfeld S. K., Teichmann S. A., et al. A census of human transcription factors: function, expression and evolution[J]. *Nat Rev Genet*,2009,10(4):252-263.
- [121] Cui Q., Yu Z., Pan Y., et al. MicroRNAs preferentially target the genes with high transcriptional regulation complexity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2007,352(3):733-738.
- [122] Pitto L., Ripoli A., Cremisi F., et al. microRNA(interference) networks are embedded in the gene regulatory networks[J]. *Cell Cycle*,2008,7(16):2458-2461.
- [123] Hu W., Chan C. S., Wu R., et al. Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504[J]. *Mol Cell*,2010,38(5):689-699.
- [124] Park S. M., Gaur A. B., Lengyel E., et al. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2[J]. *Genes Dev*,2008,22(7):894-907.
- [125] Moss S. F., Blaser M. J. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer[J]. *Nat Clin Pract Oncol*,2005,2(2):90-97, 1-113.
- [126] Staudt L. M. Oncogenic activation of NF-kappaB[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*,2010, 2(6):a109.
- [127] Ruland J. Return to homeostasis: downregulation of NF-kappaB responses[J]. *Nat Immunol*, 2011,12(8):709-714.
- [128] Verhelst K., Verstrepen L., Carpentier I., et al. IkappaB kinase epsilon (IKKepsilon): a therapeutic target in inflammation and cancer[J]. *Biochem Pharmacol*,2013,85(7):873-880.
- [129] Peek R. J., Blaser M. J. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas[J]. *Nat Rev Cancer*,2002,2(1):28-37.
- [130] Delgado-Rosado G., Dominguez-Bello M. G., Massey S. E. Positive selection on a bacterial oncoprotein associated with gastric cancer[J]. *Gut Pathog*,2011,3:18.
- [131] Lemke L. B., Ge Z., Whary M. T., et al. Concurrent Helicobacter bilis infection in C57BL/6 mice attenuates proinflammatory H. pylori-induced gastric pathology[J]. *Infect Immun*,2009,77(5): 2147-2158.
- [132] Fischer W. Assembly and molecular mode of action of the Helicobacter pylori Cag type IV secretion apparatus[J]. *FEBS J*,2011,278(8):1203-1212.

- [133] Maeda S., Yoshida H., Ogura K., et al. H. pylori activates NF-kappaB through a signaling pathway involving IkappaB kinases, NF-kappaB-inducing kinase, TRAF2, and TRAF6 in gastric cancer cells[J]. *Gastroenterology*,2000,119(1):97-108.
- [134] Polk D. B., Peek R. J. Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond[J]. *Nat Rev Cancer*,2010, 10(6):403-414.
- [135] Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*,2011, 144(5): 646-674.
- [136] Shah M. A., Ajani J. A. Gastric cancer--an enigmatic and heterogeneous disease[J]. *JAMA*, 2010,303(17):1753-1754.
- [137] Eccles S. A., Welch D. R. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies[J]. *Lancet*,2007,369(9574):1742-1757.
- [138] Samani A. A., Yakar S., Leroith D., et al. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights[J]. *Endocr Rev*,2007,28(1):20-47.
- [139] Dunn S. E., Ehrlich M., Sharp N. J., et al. A dominant negative mutant of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits the adhesion, invasion, and metastasis of breast cancer[J]. *Cancer Res*,1998,58(15):3353-3361.
- [140] Reinmuth N., Liu W., Fan F., et al. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer[J]. *Clin Cancer Res*,2002,8(10):3259-3269.
- [141] Yang J., Weinberg R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis[J]. *Dev Cell*,2008,14(6):818-829.
- [142] Zhao X., Lu Y., Nie Y., et al. MicroRNAs as critical regulators involved in regulating epithelial-mesenchymal transition[J]. *Curr Cancer Drug Targets*,2013,13(9):935-944.
- [143] Wijnhoven B. P., Dinjens W. N., Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer[J]. *Br J Surg*,2000,87(8):992-1005.
- [144] Batlle E., Sancho E., Franci C., et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells[J]. *Nat Cell Biol*,2000,2(2):84-89.
- [145] Cano A., Perez-Moreno M. A., Rodrigo I., et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression[J]. *Nat Cell Biol*,2000,2(2):76-83.
- [146] Massague J. TGFbeta in Cancer[J]. *Cell*,2008,134(2):215-230.
- [147] Kim H. J., Litzenburger B. C., Cui X., et al. Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail[J]. *Mol Cell Biol*,2007,27(8):3165-3175.

# 附 录

附表 1 BGC823 细胞过表达 miR-7 后在蛋白水平表达上调的分子

Gene Symbol	Replicate 1 Log <sub>2</sub> protein ratio	Replicate 2 Log <sub>2</sub> protein ratio	Mean protein fold change
<i>FAM111A</i>	2.33	3.88	3.10
<i>FAM103A1</i>	2.24	2.92	2.58
<i>CXCL12</i>	2.14	2.78	2.46
<i>STK17A</i>	2.18	2.72	2.45
<i>RPL32P3</i>	2.01	2.84	2.42
<i>LOC339352</i>	2.01	2.77	2.39
<i>METTL18</i>	2.10	1.85	1.97
<i>DCTN2</i>	1.96	1.80	1.88
<i>C7</i>	2.06	1.45	1.75
<i>MCM3AP</i>	1.93	1.55	1.74
<i>C12orf10</i>	1.73	1.65	1.69
<i>OR6K2</i>	1.84	1.48	1.66
<i>NAA25</i>	1.78	1.50	1.64
<i>ALPL</i>	1.51	1.64	1.57
<i>APOO</i>	1.52	1.50	1.51
<i>DDX11</i>	1.40	1.62	1.51
<i>LILRP2</i>	1.45	1.50	1.47
<i>SMN1</i>	1.64	1.22	1.43
<i>ZNF813</i>	1.40	1.43	1.41
<i>LOC729852</i>	1.30	1.52	1.41
<i>GPR115</i>	1.56	1.24	1.40
<i>TMEM8A</i>	1.51	1.25	1.38
<i>UTP11L</i>	1.31	1.39	1.35
<i>MAP2</i>	1.37	1.25	1.31
<i>BBS9</i>	1.39	1.21	1.30
<i>SNRPD1</i>	1.41	1.18	1.29
<i>AIFM2</i>	1.33	1.25	1.29
<i>LYZL1</i>	1.27	1.29	1.28
<i>SYNRG</i>	1.21	1.31	1.26
<i>PHOSPHO2-KLHL23</i>	1.26	1.22	1.24
<i>RRP1</i>	1.21	1.25	1.23
<i>CHTF18</i>	1.43	0.99	1.21
<i>GJB2</i>	1.33	1.10	1.21
<i>ACBD7</i>	1.28	1.12	1.20

---

<i>DYNLRB1</i>	1.09	1.29	1.19
<i>ERAP1</i>	1.38	1.00	1.19
<i>RPS18</i>	1.13	1.25	1.19
<i>RGPI</i>	1.18	1.18	1.18
<i>IFIT2</i>	1.03	1.31	1.17
<i>CAT</i>	1.37	0.97	1.17
<i>LOC100506334</i>	1.05	1.28	1.16
<i>SOX9</i>	1.17	1.11	1.14
<i>MNAT1</i>	1.08	1.16	1.12
<i>FLJ43826</i>	1.22	1.02	1.12
<i>CST1</i>	1.17	1.07	1.12
<i>IFT81</i>	1.12	1.08	1.10
<i>THOC7</i>	1.20	1.00	1.10
<i>LOC100506455</i>	1.29	0.91	1.10
<i>UROD</i>	1.19	1.01	1.10
<i>LSG1</i>	1.09	1.10	1.09
<i>PAGE5</i>	1.14	1.02	1.08
<i>ZNF468</i>	1.11	1.05	1.08
<i>ZNF587</i>	0.87	1.25	1.06
<i>DHRS7</i>	1.03	1.04	1.03
<i>ULK4</i>	1.15	0.91	1.03
<i>EZR</i>	1.04	1.03	1.03
<i>HTR7</i>	1.19	0.87	1.03
<i>TMED7-TICAM2</i>	1.19	0.85	1.02

---

附表 2 BGC823 细胞过表达 miR-7 后在蛋白水平表达下调的分子

Gene Symbol	Replicate 1 Log <sub>2</sub> protein ratio	Replicate 2 Log <sub>2</sub> protein ratio	Mean protein fold change
<i>CTSE</i>	-2.73	-2.64	-2.69
<i>TDGF1</i>	-2.40	-2.28	-2.34
<i>N4BP2L2</i>	-2.26	-2.22	-2.24
<i>MUC13</i>	-2.06	-2.02	-2.04
<i>PLA2G2E</i>	-2.01	-1.93	-1.97
<i>ZNF169</i>	-1.96	-1.89	-1.92
<i>SELENBP1</i>	-1.89	-1.93	-1.91
<i>CLEC3B</i>	-1.82	-1.84	-1.83
<i>SIN3B</i>	-1.85	-1.80	-1.83
<i>MANIC1</i>	-1.80	-1.83	-1.81
<i>MLLT1</i>	-1.77	-1.79	-1.78
<i>MAP3K8</i>	-1.74	-1.78	-1.76
<i>PIWIL2</i>	-1.75	-1.73	-1.74
<i>TACC2</i>	-1.73	-1.70	-1.72
<i>IGF1</i>	-1.71	-1.71	-1.71
<i>IGF2BP2</i>	-1.69	-1.71	-1.70
<i>SLC12A4</i>	-1.67	-1.68	-1.68
<i>SLC39A4</i>	-1.64	-1.66	-1.65
<i>DES</i>	-1.66	-1.63	-1.65
<i>CDC45</i>	-1.61	-1.63	-1.62
<i>SLC5A1</i>	-1.60	-1.61	-1.61
<i>BCL2L1</i>	-1.60	-1.58	-1.59
<i>C16orf71</i>	-1.58	-1.59	-1.59
<i>EGFR</i>	-1.58	-1.57	-1.57
<i>SLPI</i>	-1.57	-1.58	-1.57
<i>F10</i>	-1.56	-1.55	-1.56
<i>IGHMBP2</i>	-1.55	-1.53	-1.54
<i>PEX1</i>	-1.52	-1.56	-1.54
<i>IL17RE</i>	-1.53	-1.54	-1.54
<i>CEACAM7</i>	-1.53	-1.55	-1.54
<i>DDX19B</i>	-1.48	-1.52	-1.50
<i>IGF1R</i>	-1.51	-1.47	-1.49
<i>ANXA1</i>	-1.46	-1.50	-1.48
<i>EXD2</i>	-1.42	-1.48	-1.45
<i>CASP4</i>	-1.40	-1.47	-1.44
<i>KCNJ2</i>	-1.45	-1.39	-1.42
<i>USP1</i>	-1.38	-1.39	-1.39
<i>S100A9</i>	-1.36	-1.39	-1.38
<i>MYH8</i>	-1.35	-1.38	-1.37

---

<i>NAGLU</i>	-1.36	-1.37	-1.36
<i>AK4</i>	-1.35	-1.37	-1.36
<i>KDM4B</i>	-1.32	-1.33	-1.33
<i>SYTL2</i>	-1.31	-1.34	-1.33
<i>IFT140</i>	-1.30	-1.35	-1.32
<i>CDX2</i>	-1.31	-1.33	-1.32
<i>RELA</i>	-1.34	-1.31	-1.32
<i>VTN</i>	-1.32	-1.31	-1.32
<i>FAM124B</i>	-1.28	-1.35	-1.32
<i>C1D</i>	-1.34	-1.29	-1.31
<i>YY1</i>	-1.30	-1.31	-1.30
<i>DNAH8</i>	-1.28	-1.32	-1.30
<i>MNX1</i>	-1.29	-1.30	-1.29
<i>GON4L</i>	-1.28	-1.30	-1.29
<i>CCRL2</i>	-1.31	-1.27	-1.29
<i>DUS1L</i>	-1.27	-1.28	-1.27
<i>PANK4</i>	-1.26	-1.28	-1.27
<i>IKBKE</i>	-1.25	-1.28	-1.27
<i>C4orf27</i>	-1.29	-1.24	-1.27
<i>PRC1</i>	-1.27	-1.26	-1.26
<i>ACAP2</i>	-1.26	-1.27	-1.26
<i>C1orf131</i>	-1.23	-1.29	-1.26
<i>MBIP</i>	-1.25	-1.26	-1.26
<i>GRAMD1B</i>	-1.26	-1.25	-1.26
<i>KRT9</i>	-1.27	-1.24	-1.26
<i>MORC3</i>	-1.23	-1.24	-1.24
<i>PIK3R3</i>	-1.24	-1.23	-1.24
<i>ZNF431</i>	-1.24	-1.22	-1.23
<i>CDH17</i>	-1.20	-1.25	-1.23
<i>FLRT3</i>	-1.20	-1.24	-1.22
<i>KRT10</i>	-0.80	-1.20	-1.00
<i>DDX51</i>	-0.77	-0.79	-0.78
<i>FAM134A</i>	-0.73	-0.79	-0.76
<i>SCAF8</i>	-0.70	-0.77	-0.73
<i>PANK1</i>	-0.68	-0.71	-0.69
<i>ATP11A</i>	-0.63	-0.70	-0.67

---

附表 3 BGC823 细胞过表达 miR-7 后在 mRNA 水平表达上调的分子

Gene Symbol	Replicate 1 Log <sub>2</sub> RNA ratio	Replicate 2 Log <sub>2</sub> RNA ratio	Mean RNA fold change
<i>MT1B</i>	2.40	4.45	3.43
<i>CST7</i>	3.89	2.92	3.40
<i>UBD</i>	3.02	3.38	3.20
<i>VTCN1</i>	3.12	3.16	3.14
<i>FST</i>	2.77	3.36	3.06
<i>LOC643401</i>	2.58	3.46	3.02
<i>ANGPT2</i>	3.02	2.72	2.87
<i>TPO</i>	2.31	3.41	2.86
<i>TXNRD3</i>	3.02	2.69	2.86
<i>TRPC3</i>	2.83	2.88	2.86
<i>CCL4</i>	2.77	2.90	2.84
<i>NPPB</i>	3.29	2.15	2.72
<i>VCX</i>	2.60	2.71	2.66
<i>MATN2</i>	2.08	3.17	2.63
<i>VCX3A</i>	2.60	2.65	2.62
<i>TTYH1</i>	2.70	2.51	2.60
<i>C2orf54</i>	2.72	2.46	2.59
<i>VCX2</i>	2.60	2.55	2.57
<i>CST6</i>	1.88	3.25	2.57
<i>MT1H</i>	2.52	2.58	2.55
<i>MT1L</i>	2.57	2.52	2.55
<i>MT1G</i>	2.47	2.58	2.52
<i>MT1E</i>	2.28	2.70	2.49
<i>ALPP</i>	2.57	2.40	2.49
<i>C6orf15</i>	2.45	2.52	2.49
<i>MT1X</i>	2.38	2.55	2.46
<i>LYG2</i>	1.78	3.12	2.45
<i>NCF2</i>	2.46	2.40	2.43
<i>FLJ26850</i>	2.39	2.46	2.42
<i>HTRA3</i>	2.34	2.46	2.40
<i>DEFB103B</i>	2.39	2.41	2.40
<i>CCL3</i>	2.57	2.21	2.39
<i>FGF9</i>	2.43	2.32	2.38
<i>HBG1</i>	1.40	3.34	2.37
<i>LOC100131138</i>	2.58	2.16	2.37
<i>ANKRD1</i>	2.50	2.24	2.37
<i>MT2A</i>	2.28	2.40	2.34
<i>LOC100506689</i>	2.19	2.37	2.28
<i>KRTAP3-1</i>	2.24	2.28	2.26



---

<i>MT1F</i>	2.17	2.24	2.21
<i>RSAD2</i>	2.12	2.20	2.16
<i>FHOD3</i>	2.06	2.25	2.16
<i>MT1A</i>	2.14	2.09	2.12
<i>ME1</i>	2.43	1.62	2.02
<i>CCL3L3</i>	2.38	1.61	2.00
<i>PAEP</i>	1.66	2.33	2.00
<i>LOC730755</i>	2.29	1.69	1.99
<i>GPR110</i>	1.91	2.02	1.97
<i>VCY</i>	2.18	1.71	1.94
<i>TNNT2</i>	2.01	1.87	1.94
<i>SIGLEC6</i>	2.03	1.86	1.94
<i>GZMB</i>	2.19	1.60	1.89
<i>ZBED2</i>	2.02	1.76	1.89
<i>COX7B2</i>	1.81	1.94	1.87
<i>SPANXD</i>	1.97	1.77	1.87
<i>MIA</i>	1.85	1.88	1.87
<i>PLAC1</i>	1.99	1.73	1.86
<i>RNF128</i>	1.63	1.94	1.79
<i>SPANXB2</i>	2.16	1.36	1.76
<i>KSR1</i>	1.74	1.78	1.76
<i>MAGEC1</i>	1.55	1.96	1.76
<i>SPANXA1</i>	1.72	1.79	1.76
<i>CXorf51A</i>	1.61	1.82	1.71
<i>ZNF114</i>	1.60	1.77	1.68
<i>ASAP1-IT1</i>	1.39	1.97	1.68
<i>ULBP2</i>	1.54	1.81	1.67
<i>LOC728485</i>	1.44	1.87	1.65
<i>SLC2A3</i>	1.69	1.50	1.60
<i>KRT34</i>	1.33	1.85	1.59
<i>SUSD2</i>	1.55	1.58	1.57
<i>XG</i>	1.51	1.55	1.53
<i>RGL1</i>	1.67	1.38	1.52
<i>C16orf73</i>	1.17	1.88	1.52
<i>VGLL1</i>	1.60	1.44	1.52
<i>KRT7</i>	1.72	1.31	1.51
<i>PRKCH</i>	1.59	1.44	1.51
<i>CRIP2</i>	1.24	1.77	1.51
<i>LOC100506262</i>	1.96	1.04	1.50
<i>SCHIP1</i>	1.49	1.50	1.49
<i>HLA-DQB1</i>	1.34	1.62	1.48
<i>GLI2</i>	1.07	1.82	1.44
<i>LY6K</i>	1.29	1.59	1.44

---

---

<i>CCND3</i>	1.47	1.40	1.43
<i>MYH7B</i>	1.44	1.39	1.42
<i>MAP1B</i>	1.41	1.42	1.41
<i>CT45A1</i>	1.35	1.48	1.41
<i>CRYAB</i>	1.42	1.38	1.40
<i>SLC2A12</i>	1.02	1.75	1.39
<i>AQP1</i>	1.51	1.26	1.39
<i>AGPAT9</i>	1.40	1.36	1.38
<i>ABAT</i>	1.35	1.41	1.38
<i>MYBL1</i>	1.36	1.38	1.37
<i>NBPF11</i>	1.48	1.24	1.36
<i>SLC2A14</i>	1.31	1.40	1.36
<i>CYFIP2</i>	1.27	1.44	1.35
<i>KRT13</i>	1.50	1.20	1.35
<i>IFIT3</i>	1.43	1.26	1.34
<i>IL2RG</i>	1.29	1.39	1.34
<i>NBPF10</i>	1.52	1.12	1.32
<i>DDX60</i>	1.39	1.25	1.32
<i>SERPINF1</i>	1.40	1.24	1.32
<i>IFIT1</i>	1.26	1.37	1.31
<i>TAS2R10</i>	1.52	1.10	1.31
<i>PRF1</i>	1.32	1.29	1.31
<i>WWC2</i>	1.51	1.08	1.29
<i>LOC100507218</i>	1.20	1.37	1.28
<i>PADI1</i>	1.17	1.35	1.26
<i>CI0orf114</i>	1.34	1.19	1.26
<i>GLS2</i>	1.16	1.34	1.25
<i>RGS9</i>	1.39	1.10	1.25
<i>COL13A1</i>	1.27	1.21	1.24
<i>CST1</i>	1.37	1.12	1.24
<i>IFI44</i>	1.09	1.39	1.24
<i>TKTL1</i>	1.29	1.18	1.23
<i>CST2</i>	1.28	1.18	1.23
<i>GADD45B</i>	1.24	1.21	1.23
<i>CCDC19</i>	1.22	1.21	1.22
<i>HEG1</i>	1.18	1.19	1.18
<i>ABHD6</i>	1.30	1.07	1.18
<i>ABCA1</i>	1.20	1.15	1.18
<i>PSG9</i>	1.05	1.30	1.18
<i>NR2F1</i>	1.08	1.27	1.18
<i>CSRP2</i>	1.20	1.15	1.18
<i>ADAMTS14</i>	1.33	1.01	1.17
<i>SYTL3</i>	1.13	1.21	1.17

---

---

<i>DKK1</i>	1.22	1.11	1.17
<i>C5orf46</i>	1.29	1.04	1.16
<i>TPM2</i>	1.12	1.21	1.16
<i>SLC16A6</i>	1.11	1.22	1.16
<i>CT45A5</i>	1.01	1.32	1.16
<i>KIF17</i>	1.23	1.10	1.16
<i>CNTNAP3</i>	1.09	1.19	1.14
<i>OASL</i>	1.10	1.17	1.14
<i>LOC84856</i>	1.13	1.12	1.13
<i>ATF3</i>	1.09	1.15	1.12
<i>RFPL1</i>	1.05	1.19	1.12
<i>SHANK2</i>	1.12	1.12	1.12
<i>DHX58</i>	1.08	1.16	1.12
<i>RTP4</i>	1.20	1.02	1.11
<i>MAP2K7</i>	1.06	1.15	1.11
<i>SLCO1B3</i>	1.18	1.00	1.09
<i>MSMB</i>	1.10	1.08	1.09
<i>ACTA2</i>	1.02	1.16	1.09
<i>IFIT2</i>	1.01	1.17	1.09
<i>SAMD4A</i>	1.12	1.03	1.07
<i>NEDD9</i>	1.01	1.14	1.07
<i>MAGEA1</i>	1.13	1.01	1.07
<i>DKFZP586B0319</i>	1.10	1.02	1.06
<i>OBFC2A</i>	1.06	1.07	1.06
<i>GAST</i>	1.01	1.07	1.04
<i>IFFO2</i>	1.01	1.01	1.01

---

附表 4 BGC823 细胞过表达 miR-7 后在 mRNA 水平表达下调的分子

Gene Symbol	Replicate 1 Log <sub>2</sub> RNA ratio	Replicate 2 Log <sub>2</sub> RNA ratio	Mean RNA fold change
<i>REG4</i>	-5.03	-4.88	-4.95
<i>DMBT1</i>	-4.33	-4.53	-4.43
<i>REG1A</i>	-3.73	-4.04	-3.89
<i>CDKN1C</i>	-3.69	-3.82	-3.75
<i>LGALS4</i>	-3.45	-3.42	-3.44
<i>CLRN3</i>	-3.33	-3.32	-3.32
<i>DACT1</i>	-3.09	-3.08	-3.08
<i>PRSS35</i>	-3.07	-3.01	-3.04
<i>FOS</i>	-3.63	-2.39	-3.01
<i>MYH13</i>	-3.03	-2.91	-2.97
<i>MYH1</i>	-3.41	-2.50	-2.96
<i>FAM151A</i>	-2.73	-2.71	-2.72
<i>C11orf86</i>	-2.37	-3.05	-2.71
<i>CYP2B7P1</i>	-2.57	-2.81	-2.69
<i>PLA2G2A</i>	-2.64	-2.72	-2.68
<i>CEACAM6</i>	-2.59	-2.67	-2.63
<i>CXCR7</i>	-2.57	-2.68	-2.63
<i>CNDP1</i>	-2.35	-2.86	-2.60
<i>CYP2B6</i>	-2.57	-2.49	-2.53
<i>LOC100128893</i>	-3.43	-1.55	-2.49
<i>MMP9</i>	-2.52	-2.44	-2.48
<i>CDH17</i>	-2.54	-2.38	-2.46
<i>HEPH</i>	-2.65	-2.23	-2.44
<i>ABCG2</i>	-2.67	-2.13	-2.40
<i>NRAP</i>	-2.09	-2.70	-2.40
<i>CLEC3B</i>	-2.27	-2.48	-2.37
<i>KLK1</i>	-2.44	-2.29	-2.36
<i>S100A9</i>	-1.90	-2.80	-2.35
<i>REG1B</i>	-2.43	-2.22	-2.33
<i>MYH8</i>	-2.17	-2.47	-2.32
<i>SLPI</i>	-2.30	-2.24	-2.27
<i>SNCAIP</i>	-2.30	-2.24	-2.27
<i>PDZRN3</i>	-2.45	-1.85	-2.15
<i>RELA</i>	-1.94	-2.27	-2.10
<i>DNAH8</i>	-2.30	-1.88	-2.09
<i>SYTL2</i>	-2.12	-1.99	-2.06
<i>UST</i>	-2.11	-1.98	-2.04
<i>HSD3B1</i>	-2.02	-2.04	-2.03
<i>SPTA1</i>	-2.07	-2.00	-2.03

---

<i>RELN</i>	-2.23	-1.83	-2.03
<i>MCHR2</i>	-1.59	-2.44	-2.01
<i>F5</i>	-2.53	-1.48	-2.00
<i>TDGF1</i>	-1.35	-2.63	-1.99
<i>AK4</i>	-1.97	-1.97	-1.97
<i>APOD</i>	-1.72	-2.14	-1.93
<i>KCNJ2</i>	-1.83	-2.03	-1.93
<i>LYZ</i>	-1.81	-2.03	-1.92
<i>REG3A</i>	-1.73	-2.06	-1.90
<i>ACSL6</i>	-2.03	-1.74	-1.89
<i>C19orf77</i>	-2.02	-1.73	-1.88
<i>CCND1</i>	-1.99	-1.69	-1.84
<i>POLE4</i>	-1.80	-1.87	-1.83
<i>BDKRB1</i>	-1.93	-1.68	-1.81
<i>BDKRB2</i>	-1.82	-1.78	-1.80
<i>C6orf223</i>	-1.31	-2.28	-1.80
<i>PRICKLE1</i>	-1.41	-2.18	-1.79
<i>ALPI</i>	-1.81	-1.75	-1.78
<i>ST6GALNAC3</i>	-1.76	-1.77	-1.77
<i>LINC00312</i>	-2.48	-1.05	-1.76
<i>KCNK10</i>	-2.11	-1.42	-1.76
<i>MYOM1</i>	-1.65	-1.84	-1.74
<i>GRK5</i>	-1.75	-1.72	-1.73
<i>GRAMD1B</i>	-2.21	-1.24	-1.72
<i>SEMA3F</i>	-1.69	-1.73	-1.71
<i>SLC12A2</i>	-1.72	-1.65	-1.68
<i>VTN</i>	-1.73	-1.62	-1.68
<i>FGFBP1</i>	-1.65	-1.70	-1.68
<i>PGM1</i>	-1.66	-1.69	-1.67
<i>DES</i>	-1.80	-1.54	-1.67
<i>F10</i>	-1.58	-1.75	-1.67
<i>RASL11A</i>	-1.69	-1.64	-1.66
<i>WDFY4</i>	-1.50	-1.80	-1.65
<i>CTSE</i>	-1.74	-1.56	-1.65
<i>AIF1</i>	-1.60	-1.67	-1.64
<i>PIK3R3</i>	-1.44	-1.83	-1.63
<i>SPINK1</i>	-1.85	-1.41	-1.63
<i>ZNF169</i>	-1.70	-1.52	-1.61
<i>GPA33</i>	-1.49	-1.71	-1.60
<i>HS3ST1</i>	-1.46	-1.72	-1.59
<i>YY1</i>	-1.68	-1.47	-1.58
<i>DAPK2</i>	-1.65	-1.50	-1.57
<i>SYNE1</i>	-1.60	-1.54	-1.57

---

---

<i>PLA2G2E</i>	-1.25	-1.86	-1.56
<i>HR</i>	-1.82	-1.27	-1.54
<i>C10orf116</i>	-1.63	-1.45	-1.54
<i>VIPR1</i>	-1.66	-1.39	-1.52
<i>LGR5</i>	-1.62	-1.42	-1.52
<i>CDHR5</i>	-1.61	-1.43	-1.52
<i>CREG2</i>	-1.61	-1.42	-1.52
<i>VRTN</i>	-1.37	-1.66	-1.51
<i>PIP5K1B</i>	-1.53	-1.46	-1.49
<i>FAM124B</i>	-1.48	-1.50	-1.49
<i>KLF2</i>	-1.54	-1.43	-1.49
<i>PDGFRA</i>	-1.46	-1.49	-1.48
<i>CCRL2</i>	-1.47	-1.48	-1.47
<i>LOC100505633</i>	-1.35	-1.59	-1.47
<i>PDZK1IP1</i>	-1.55	-1.39	-1.47
<i>ATP1B1</i>	-1.41	-1.53	-1.47
<i>SLC5A1</i>	-1.56	-1.37	-1.46
<i>DNAH2</i>	-1.48	-1.45	-1.46
<i>LIPG</i>	-1.41	-1.50	-1.46
<i>SEMA3B</i>	-1.51	-1.38	-1.45
<i>CCND2</i>	-1.52	-1.37	-1.44
<i>ANXA1</i>	-1.54	-1.35	-1.44
<i>IL1B</i>	-1.59	-1.30	-1.44
<i>FAM113B</i>	-1.76	-1.12	-1.44
<i>SULT2A1</i>	-1.27	-1.60	-1.43
<i>TM4SF5</i>	-1.38	-1.49	-1.43
<i>MUC13</i>	-1.48	-1.38	-1.43
<i>MAN1C1</i>	-1.44	-1.42	-1.43
<i>FCAMR</i>	-1.48	-1.37	-1.43
<i>HOXA7</i>	-1.17	-1.68	-1.42
<i>VSIG2</i>	-1.58	-1.27	-1.42
<i>CEACAM7</i>	-1.55	-1.29	-1.42
<i>ITLN1</i>	-1.73	-1.10	-1.41
<i>MYO15B</i>	-1.60	-1.20	-1.40
<i>FCGR2A</i>	-1.72	-1.06	-1.39
<i>RNF186</i>	-1.05	-1.73	-1.39
<i>BCL2L1</i>	-1.40	-1.37	-1.39
<i>CHRNA7</i>	-1.38	-1.39	-1.38
<i>TFF1</i>	-1.71	-1.02	-1.37
<i>FGB</i>	-1.09	-1.63	-1.36
<i>DEFB1</i>	-1.58	-1.14	-1.36
<i>ST6GALNAC1</i>	-1.54	-1.17	-1.35
<i>LOC145837</i>	-1.51	-1.19	-1.35

---

<i>RGN</i>	-1.30	-1.40	-1.35
<i>EFNB2</i>	-1.31	-1.34	-1.33
<i>KRT6B</i>	-1.35	-1.30	-1.32
<i>KLK10</i>	-1.37	-1.25	-1.31
<i>SLCO2A1</i>	-1.14	-1.48	-1.31
<i>GPR162</i>	-1.23	-1.38	-1.31
<i>KIF26B</i>	-1.31	-1.30	-1.31
<i>MGAT3</i>	-1.27	-1.33	-1.30
<i>HOTTIP</i>	-1.04	-1.53	-1.29
<i>CALML4</i>	-1.23	-1.32	-1.28
<i>TBX4</i>	-1.32	-1.22	-1.27
<i>APOA2</i>	-1.26	-1.28	-1.27
<i>CYP2F1</i>	-1.26	-1.27	-1.27
<i>SAMD11</i>	-1.49	-1.04	-1.26
<i>H19</i>	-1.23	-1.29	-1.26
<i>SLC39A10</i>	-1.14	-1.36	-1.25
<i>MIRLET7BHG</i>	-1.33	-1.16	-1.25
<i>ASGR2</i>	-1.37	-1.12	-1.24
<i>EGFR</i>	-1.18	-1.28	-1.23
<i>IGF1</i>	-1.23	-1.22	-1.23
<i>NEURL3</i>	-1.19	-1.27	-1.23
<i>PAQR8</i>	-1.20	-1.25	-1.22
<i>MPP1</i>	-1.39	-1.05	-1.22
<i>FZD9</i>	-1.30	-1.14	-1.22
<i>SH3TC1</i>	-1.09	-1.36	-1.22
<i>IL17RE</i>	-1.41	-1.02	-1.21
<i>CDX2</i>	-1.42	-1.00	-1.21
<i>LOC100507039</i>	-1.32	-1.08	-1.20
<i>TJP3</i>	-1.19	-1.21	-1.20
<i>FLRT3</i>	-1.31	-1.08	-1.20
<i>AMICA1</i>	-1.13	-1.26	-1.19
<i>THRA</i>	-1.21	-1.17	-1.19
<i>FAM109A</i>	-1.19	-1.15	-1.17
<i>MBIP</i>	-1.16	-1.18	-1.17
<i>ATP8A1</i>	-1.29	-1.05	-1.17
<i>SLC39A4</i>	-1.03	-1.30	-1.17
<i>LYPD6B</i>	-1.10	-1.20	-1.15
<i>C9orf150</i>	-1.08	-1.18	-1.13
<i>ACSM3</i>	-1.12	-1.13	-1.12
<i>SELENBP1</i>	-1.08	-1.16	-1.12
<i>BAIAP3</i>	-1.01	-1.22	-1.12
<i>SARM1</i>	-1.06	-1.17	-1.11
<i>PCSK9</i>	-1.08	-1.14	-1.11

---

<i>PIWIL2</i>	-1.11	-1.09	-1.10
<i>MGC4294</i>	-1.10	-1.06	-1.08
<i>IGF2BP2</i>	-1.06	-1.10	-1.08
<i>GALC</i>	-1.06	-1.08	-1.07
<i>OAT</i>	-1.02	-1.11	-1.07
<i>CASP4</i>	-1.12	-1.01	-1.06
<i>CYP17A1</i>	-1.09	-1.03	-1.06
<i>TMC5</i>	-1.00	-1.10	-1.05
<i>ODAM</i>	-1.05	-1.04	-1.04
<i>HYAL1</i>	-1.02	-1.06	-1.04
<i>AMIGO2</i>	-1.03	-1.05	-1.04
<i>TSPAN8</i>	-1.01	-1.05	-1.03

---



# 个人简历和研究成果

## 个人简介

赵晓迪, 男, 1987年1月出生。2009年6月毕业于南方医科大学(原第一军医大学), 获医学学士学位。2009年9月考入第四军医大学西京医院全军消化疾病研究所、肿瘤生物学国家重点实验室, 导师为中国工程院院士樊代明教授。2012年1月获准硕博连读。2013年12月获国家留学基金委资助赴美国哈佛医学院联合培养。

## 主要研究成果 (以下为第一作者或共同第一作者论文)

1. Zhao X., He L., Li T., et al. SRF expedites metastasis and modulates the epithelial to mesenchymal transition by regulating miR-199a-5p expression in human gastric cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(12):1900-1913.
2. Zhao X., Dou W., He L., et al. MicroRNA-7 functions as an anti-metastatic microRNA in gastric cancer by targeting insulin-like growth factor-1 receptor[J]. *Oncogene*, 2013, 32(11):1363-1372.
3. Zhao X., Lu Y., Nie Y., et al. MicroRNAs as critical regulators involved in regulating epithelial- mesenchymal transition[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(9):935-944.
4. Lu Y., Zhao X., Luo G., et al. Thioredoxin-like protein 2b facilitates colon cancer cell proliferation and inhibits apoptosis via NF-kappaB pathway[J]. *Cancer Lett*, 2014.
5. Lu Y., Zhao X., Li K., et al. Thioredoxin-like protein 2 is overexpressed in colon cancer and promotes cancer cell metastasis by interaction with ran[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(9):899-911.
6. Zhou L., Zhao X., Han Y., et al. Regulation of UHRF1 by miR-146a/b modulates gastric cancer invasion and metastasis[J]. *FASEB J*, 2013, 27(12):4929-4939.
7. Li T., Lu Y. Y., Zhao X. D., et al. MicroRNA-296-5p increases proliferation in gastric cancer through repression of Caudal-related homeobox 1[J]. *Oncogene*, 2014, 33(6):783-793.

8. He L., Zhao X., Wang H., et al. RUNX3 mediates suppression of tumor growth and metastasis of human CCRCC by regulating cyclin related proteins and TIMP-1[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e32961.
9. Liang S., He L., Zhao X., et al. MicroRNA let-7f inhibits tumor invasion and metastasis by targeting MYH9 in human gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4):e18409.
10. Deng L., Lu Y., Zhao X., et al. Ran GTPase protein promotes human pancreatic cancer proliferation by deregulating the expression of Survivin and cell cycle proteins[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440(2):322-329.

## 获奖情况

2011 年获中华医学会第十一次全国消化疾病学术会议中青年英文论文 一等奖

## 致 谢

硕博六年，时光匆匆。当疾疾敲击键盘的指尖抵达这一页时，时光仿佛停滞、倒流——我看见六年前的自己——怀着对医学的敬畏、对科学的憧憬和对未来的期盼，踏上了这段异常艰辛却异彩纷呈的旅途。

“既然选择了远方，便只顾风雨兼程”。这六年的求索是我终生取之不尽的财富，所以回忆中的那些迷茫、彷徨和追寻真理的寒苦都不值一提。谨借此论文完成之际，向教诲和帮助我的师长、同窗和朋友们致以最诚挚的感谢，是你们与我一道成就了这段百感交集、温暖人心的旅程。

衷心感谢导师樊代明院士在科学道路上的引领和培育！是您独树一帜的科学思维和独出心裁的科研视角给予我灵感启发，是您求精不止的科研态度和不知疲倦的科研热忱激励我迎难而上，是您的“精品战略”为本研究提供了强大动力和制度保障。感谢辅导教师聂勇战教授和时永全教授对本研究的悉心指导！二位教授渊博的学识、严谨的学风不断感染和塑造着我，是您们对研究方向的精准把握和实验细节的严谨把关，才得以保证本研究的顺利进行。

感谢吴开春教授、韩英教授、丁杰教授和赵青川教授在工作和学习中给予的亲切指教和热情关照！感谢王新教授、郭学刚教授、李增山教授、张德新副教授、张筱茵副教授、潘阳林副教授、陈铮副主任技师、唐光波技师、窦建华技师、田祖宏技师、田苗苗技师以及西京消化大家庭中的全体医护和工作人员六年来给予的关心和帮助！感谢何丽洁博士、梁淑丽硕士、郭昊博士后、帖君博士、王思萌博士生、胡思隽博士后、刘娜博士、赵丽娜博士、罗贯虹博士、李凯博士、任贵博士、封斌博士、吴琼博士、蔡习强博士、周金锋博士等在研究中给予的建议和帮助！感谢课题组成员李铤博士生、申高飞硕士、周林博士、韩亚楠硕士、李进晶博士生、夏秀娟硕士生、魏彦玲硕士、李红硕士、朱飞硕士等在实验中的协助！

特别感谢我的爱人和家人的陪伴、支持和关怀，是你们催生我一路走来且继续前行的力量和勇气。

最后，感谢一直坚守内心、未曾轻言放弃的自己。