

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research靶向 GAGE12I 的 *miR-28-5p* 体外抑制
胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的研究*MiR-28-5p* targeting GAGE12I inhibits gastric cancer cell proliferation,
migration and invasion *in vitro*肖丽萍¹, 曾庆芳², 詹涛³

(1. 赣州市人民医院/南方医院 赣州医院 肿瘤科, 江西 赣州 341000; 2. 赣州市肿瘤医院 肿瘤科, 江西 赣州 341000; 3. 景德镇第一人民医院 肿瘤科, 江西 景德镇 351000)

XIAO Li-ping¹, ZENG Qing-fang²,
ZHAN Tao³

(1. Oncology Department, Ganzhou People's Hospital/Southern Hospital Ganzhou Hospital, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China; 2. Oncology Department, Ganzhou Cancer Hospital, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China; 3. Department of Oncology, Jingdezhen First People's Hospital, Jingdezhen 351000, Jiangxi Province, China)

基金项目: 江西省卫健委科技计划基金资助项目(202311986)

作者简介: 肖丽萍(1977-), 女, 副主任护师, 主要从事肿瘤护理方面的工作

通信作者: 曾庆芳, 副主任医师

MP: 15979828609

E-mail: mitian676@yeah.net

摘要:目的 探讨靶向 G 抗原 12I 抗体(GAGE12I)的微小核糖核酸-28-5p(*miR-28-5p*)对体外抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。方法 将SGC-7901细胞分为 *miR-28-5p* 组(*miR-28-5p* 模拟物)、*miR-NC* 组(*miR-28-5p* 空白模拟物)、shGAGE12I 组(*GAGE12I* 敲除)、空白组(*GAGE12I* 未敲除)。用四甲基偶氮唑盐比色法和侵袭实验小室检测细胞的增殖、迁移和侵袭能力,用生物信息学分析和荧光素酶活性检测 *miR-28-5p* 与 *GAGE12I* 的相互作用。结果 *miR-28-5p* 组与 *miR-NC* 组的增殖率分别为 $(99.90 \pm 10.30)\%$ 和 $(48.25 \pm 4.15)\%$, 侵袭率分别为 $(145.57 \pm 14.52)\%$ 和 $(67.30 \pm 6.95)\%$, 迁移率分别为 $(103.58 \pm 10.75)\%$ 和 $(43.18 \pm 4.26)\%$, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。shGAGE12I 组和空白组的增殖率分别为 $(99.80 \pm 10.20)\%$ 和 $(35.50 \pm 3.58)\%$, 侵袭率分别为 $(142.70 \pm 13.65)\%$ 和 $(65.30 \pm 6.75)\%$, 迁移率分别为 $(103.55 \pm 10.06)\%$ 和 $(48.38 \pm 4.52)\%$, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。*GAGE12I* 为 *miR-28-5p* 的靶标。结论 *miR-28-5p* 负调控 *GAGE12I*, 减少胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

关键词: G 抗原 12I 抗体; 微小核糖核酸-28-5p; 胃癌; 增殖; 迁移; 侵袭研究

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.06.008

中图分类号: R97

文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)06-0790-04

Abstract: Objective To investigate the *in vitro* inhibitory effects of microRNA-28-5p (*miR-28-5p*) targeting G antigen 12I antibody (GAGE12I) on the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells. **Methods** SGC-7901 cell were randomly divided into *miR-28-5p* group (*miR-28-5p* mimic), *miR-NC* group (*miR-28-5p* negative control mimic), shGAGE12I group (*GAGE12I* knockout) and blank group (*GAGE12I* not knockout). Cell proliferation, migration, and invasion capabilities were evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay and invasion chambers. Bioinformatics analysis and luciferase activity assays were conducted to examine the interaction between *miR-28-5p* and *GAGE12I*. **Results** The proliferation rates of *miR-28-5p* and *miR-NC* groups were $(99.90 \pm 10.30)\%$ and $(48.25 \pm 4.15)\%$; the invasion rates were $(145.57 \pm 14.52)\%$ and $(67.30 \pm 6.95)\%$; the mobility rates were $(103.58 \pm 10.75)\%$ and $(43.18 \pm 4.26)\%$, respectively, the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The proliferation rates of shGAGE12I group

and blank group were $(99.80 \pm 10.20)\%$ and $(35.50 \pm 3.58)\%$; the invasion rates were $(142.70 \pm 13.65)\%$ and $(65.30 \pm 6.75)\%$; the mobility rates were $(103.55 \pm 10.06)\%$ and $(48.38 \pm 4.52)\%$, respectively, the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). *GAGE12I* was the target of *miR-28-5p*. **Conclusion** *MiR-28-5p* negatively regulates *GAGE12I* and reduces the proliferation, invasion and migration of gastric cancer cells.

Key words: G antigen 12I antibody; microRNAs-28-5p; gastric cancer; proliferation; migration; invasion studies

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病机制复杂。胃癌的转移是导致死亡的重要原因。胃癌细胞的侵袭和迁移受多种基因调控,研究胃癌细胞的分子发病机制对肿瘤的治疗具有重要意义^[1]。微小核糖核酸(microRNAs, miRNAs)是一类高度保守的单链RNA,可以通过与靶基因的mRNA分子结合来诱导或抑制mRNA的翻译^[2]。*MiR-28-5p*是存在于人体组织中的miRNAs之一,与肿瘤的发生有关。研究发现,这种miRNA在肾癌和结肠癌中的表达下调,表明*miR-28-5p*可能在肿瘤中发挥抑制作用^[3-4]。G抗原12I抗体(G antigen 12I antibody, *GAGE12I*)是一种肿瘤转移促进因子,可诱导胃癌细胞侵袭和迁移^[5]。本研究通过检测*miR-28-5p*在胃癌细胞中的表达水平,探讨*miR-28-5p*对胃癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响及其机制,以期阐明胃癌的发生发展机制提供参考。

材料与方法

1 材料

细胞 正常胃上皮细胞GES-1,人胃癌细胞株SGC-7901、AGS、MGC-803,均购自中国科学院上海细胞库。

药品与试剂 *GAGE12I*抗体,购于美国Abcam公司;SYBR Green实时定量聚合酶链反应试剂盒,购于上海生工生物工程有限公司;miR-28-5p模拟,购于美国Balmico Biotech公司;GAGE12I shRNA及shRNA对照,均购于北京奥瑞东源生物技术;BCA试剂盒,购于美国Thermo Fisher公司。

仪器 1861096实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)仪,美国Bio-Rad公司产品。

2 实验方法

2.1 RT-qPCR测定mRNA活性^[2]

将Trizol试剂加入人胃癌细胞系SGC-7901、AGS、MGC-803和正常胃黏膜上皮细胞GES-1中提取RNA。 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,用逆转录试剂盒扩增。扩增反应包括 $2 \times \text{SYBR Green}$ 混合液 $10\text{ }\mu\text{L}$,RT产物 $2\text{ }\mu\text{L}$,正、反向引物各 $0.8\text{ }\mu\text{L}$, ddH_2O $6.4\text{ }\mu\text{L}$,用RT-qPCR仪进行实时定量分析,扩增程序为:

$95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s ,总循环40次。定量比较用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法。

2.2 细胞培养、细胞分组与处置方法^[4]

将SGC-7901细胞接种于6个孔板中,每个孔板包含 5×10^5 个细胞,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 条件下培养过夜。当细胞密度为50%时,进行细胞转染法。

将转染miR-28-5p模拟物、miR-28-5p空白模拟物、*GAGE12I*敲除和*GAGE12I*未敲除对照的SGC-7901细胞分别记为miR-28-5p组、miR-NC组、sh*GAGE12I*组和空白组。将miR-28-5p模拟物、miR-28-5p空白模拟物、sh*GAGE12I*、空白shRNA对照加入OPTI-MEM $245\text{ }\mu\text{L}$ 中,室温孵育20 min。去除OPTI-MEM,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤细胞2次。加入含10%胎牛血清的RPMI1640培养液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育48 h。

2.3 四甲基偶氮唑盐比色法测定细胞存活率^[5]

将miR-28-5p和miR-NC组细胞以每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ 培养液中 $6 \times 10^4\text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度接种到96孔板中,分别孵育24、48、72 h,每孔加入四甲基偶氮唑盐溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下再培养4 h,吸收孔中的上清液,加入二甲基亚砷溶液 $150\text{ }\mu\text{L}$ 。上清液在低速摇床中摇动10 min。用酶标仪检测570 nm处的光密度值。根据说明书步骤计算细胞存活率。

2.4 Transwell法检测细胞侵袭情况^[1]

Matrigel在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下溶解,RPMI1640培养基在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热,用Matrigel稀释。剩余的液体是从井里收集出来的。将miR-28-5p和miR-NC组细胞接种到孔室中,每孔增加 5×10^4 个细胞。孵育24 h后,清除未穿透细胞膜的细胞,在200倍显微镜下计数侵袭细胞数。

2.5 靶基因的预测和鉴定荧光素酶活性^[3]

根据TargetScan和PITAR软件的生物信息学分析,miR-28-5p的目的基因可能是*GAGE12I*。根据*GAGE12I* 3'-UTR结合位点构建野生型(WT)和突变型(MUT)荧光素酶报告载体,分别与miR-28-5p模拟物和模拟对照共转染SGC-7901细胞,检测荧光素酶活性。

2.6 蛋白质印迹法检测相关蛋白的相对表达水平^[6]

MiR-28-5p组和miR-NC组在加入RIPA缓冲液的情况下收集细胞,用BCA试剂盒测定细胞裂

解物上清液中的浓度。PVDF膜在5%牛血清白蛋白中孵育1 h,然后用TBST洗涤3次,加入GAGE12I抗体(1:100)或GAPDH抗体(1:100)作为负载对照。在4℃下放置过夜,用硫代巴比妥酸乙酯洗涤3次,然后与二抗孵育1 h,用Thermo Fisher化学发光底物试剂盒发光,凝胶成像仪成像,分析每一条带的灰度值,用Image J半定量分析蛋白表达水平。

3 统计学方法

用SPSS 23.0软件进行统计分析。正态分布测量的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用student *t*检验。计数资料以率(%)表示,组间比较用 χ^2 检验。用Logistic回归分析RD的危险因素。

结 果

1 *miR-28-5p*在胃癌细胞中表达及其抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭

人胃癌细胞系和正常胃上皮细胞的*miR-28-5p*表达水平分别为 1.03 ± 0.11 和 3.15 ± 0.32 ,在统计学上差异有统计学意义($P < 0.05$)。*miR-28-5p*组与*miR-NC*组的增殖率分别为 $(99.90 \pm 10.30)\%$ 和 $(48.25 \pm 4.15)\%$,侵袭率分别为 $(145.57 \pm 14.52)\%$ 和 $(67.30 \pm 6.95)\%$,迁移率分别为 $(103.58 \pm 10.75)\%$ 和 $(43.18 \pm 4.26)\%$,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

2 癌细胞中GAGE12I蛋白的相对表达水平

*miR-28-5p*组给予*miR-28-5p*模拟物;*miR-NC*组给予*miR-28-5p*空白模拟物。

*miR-28-5p*组和*miR-NC*组对比显示,用TargetScan和PITAR软件进行的生物信息学分析提供了*miR-28-5p*和GAGE12I的结合位点,表明GAGE12I可能是*miR-28-5p*的靶点。荧光素酶活性测定验证了这一预测,结果表明,*miR-28-5p*模拟物和GAGE12I-WT共转染后,荧光素酶活性降低。*miR-28-5p*过表达后,胃癌细胞中GAGE12I蛋白的相对表达水平显著降低(0.38 ± 0.05 vs 0.99 ± 0.12 , $P < 0.05$),见图1。

3 敲除GAGE12I基因对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

shGAGE12I组给予GAGE12I敲除;空白组给予GAGE12I未敲除。

shGAGE12I组和空白组的增殖率分别为 $(99.80 \pm 10.20)\%$ 和 $(35.50 \pm 3.58)\%$,侵袭率分别为 $(142.70 \pm 13.65)\%$ 和 $(65.30 \pm 6.75)\%$,迁移率分

别为 $(103.55 \pm 10.06)\%$ 和 $(48.38 \pm 4.52)\%$,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图2。

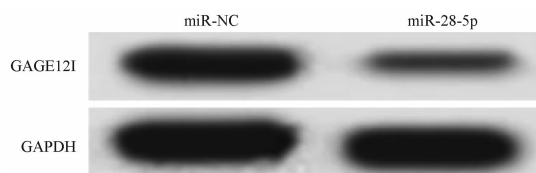


图1 用蛋白质印迹法检测*miR-28-5p*过表达后胃癌细胞中G抗原12I抗体(GAGE12I)蛋白的表达

Figure 1 The G antigen 12I antibody (GAGE12I) protein expression in gastric cancer cells after *miR-28-5p* overexpression was detected by Western blot

miR-NC group: miR-28-5p negative control mimic; miR-28-5p group: miR-28-5p mimic.

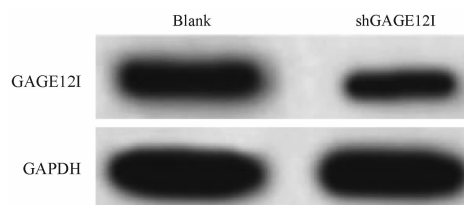


图2 基因敲除GAGE12I抑制胃癌细胞的增殖

Figure 2 Genetic knockout of GAGE12I inhibits the proliferation of gastric cancer cells

Blank group: GAGE12I not knockout; ShGAGE12I group: GAGE12I knockout.

讨 论

本研究发现,*miR-28-5p*可以与GAGE12I 3'非编码区结合,负调控GAGE12I的表达,表明GAGE12I是*miR-28-5p*的靶基因。*miR-28-5p*与肿瘤进展密切相关。在肝癌和B细胞淋巴瘤研究表明,*miR-28-5p*可能是一种肿瘤抑制因子。对肺癌的研究表明,*miR-28-5p*在肿瘤组织中的表达降低,并且*miR-28-5p*的表达水平与肿瘤的转移和侵袭密切相关^[6]。本研究还发现,*miR-28-5p*在胃癌细胞中的表达明显低于在正常胃上皮细胞中的表达,表明*miR-28-5p*在胃癌中的表达下调,这与上述结果一致^[7]。本研究也证实了*miR-28-5p*的过表达可以抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭,提示*miR-28-5p*在肿瘤中的潜在治疗价值。本课题组推测这可能与细胞周期过程、细胞凋亡和上皮-间充质转化有关,这些都是有待进一步研究的问题^[8]。*miR-28-5p*的功能是通过调节其靶基因的表达来实现的。GAGE12B能促进胃癌细胞的转移和生长^[9],下调GAGE12I可以抑制胃癌细胞的侵袭和迁移,降低

胃癌细胞的增殖,说明 GAGE12I 是胃癌进展的启动子^[10]。本研究还证实了 *miR-28-5p* 通过靶向 GAGE12I 调控胃癌进展。

本研究提示:*miR-28-5p* 过表达可以抑制胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

参考文献:

- [1] CHEN T, WANG H, YAN H. *miR-28-5p* inhibits cholangiocarcinoma progression and predicts good prognosis of patients [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(19): 2079—2090.
- [2] PEREZ E G, BELTRAN F O, ARECHAGA E, *et al.* The E6 oncoprotein of HPV16 AA-c variant regulates cell migration through the MINCR/*miR-28-5p*/RAP1B axis[J]. *Viruses*, 2022, 14(5): 1011—1017.
- [3] WANG M, DAI T, MENG Q, *et al.* Regulatory effects of *miR-28* on osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 684—696.
- [4] LIU Q, YAN S, YUAN Y, *et al.* *miR-28-5p* improved carotid artery stenosis by regulating vascular smooth muscle cell proliferation and migration[J]. *Vascular*, 2022, 30(4): 764—770.
- [5] MAO W, WANG S, CHEN R, *et al.* lncRNA NORAD promotes lung cancer progression by competitively binding to *miR-28-3p* with E2F2[J]. *Open Med (Wars)*, 2022, 17(1): 1538—1549.
- [6] 康天,李杨,路晓飞,等. *miR-28-5p* 靶向 BECN1 对 OCI-LY7 细胞凋亡及自噬过程的调控作用[J]. 河北医药, 2024, 46(6): 805—810.
- [7] 康天,李杨,路晓飞,等. *miR-28-5p* 靶向 BECN1 对 OCI-LY7 细胞凋亡及自噬过程的调控作用[J]. 河北医药, 2024, 46(6): 805—810.
- [8] 魏校通,闫威,陈勇,等. *miR-28-5p* 靶向 DOK4 对口腔鳞状细胞癌增殖的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2024, 29(1): 22—30.
- [9] LIU Q H, DAI G R, WANG X N, *et al.* CDK12 activates MYC to repress *miR-28-5p*/EZH2 and amplifies tonic BCR signaling to promote the development of diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(8—9): 1207—1216.
- [10] ZHANG J, YAO Y, LI H, *et al.* *miR-28-3p* inhibits prostate cancer cell proliferation, migration and invasion, and promotes apoptosis by targeting ARF6[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(5): 1205.

(收稿日期 2024-08-15)

· 科学文摘 ·

胰高血糖素样肽-1受体激动药和2型糖尿病患者自杀风险的相关性研究

引自:SHAPIRO S B, *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and risk of suicidality among patients with type 2 diabetes: Active comparator, new user cohort study [J/OL]. *BMJ*, 2025, 388: e080679. 2025-02-26 [2025-03-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40010803/>.

SHAPIRO 等评价胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 受体激动药是否与2型糖尿病患者自杀风险增加有关。该研究收集了2个队列,第1个队列由2007-01-01—2020-12-31开始并继续用GLP-1受体激动药或二肽基肽酶-4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP-4) 抑制药的患者组成,第2个队列由2013-01-01—2020-12-31开始并继续用GLP-1受体激动药或钠-葡萄糖协同转运蛋白-2 (sodium-glucose cotransporter-2, SGLT-2) 抑制药的患者组成。2个队列均随访到2021-03-29。主要结果是自杀倾向,定义为自杀意念、自残和自杀的综合表现。

该研究结果显示,第1个队列中包括36 082例GLP-1受体激动药使用者(中位随访1.3年)和234 028例DPP-4抑制药使用者(中位随访时间为1.7年)。在初步分析中,与DPP-4抑制药相比,GLP-1受体激动药的使用与自杀发生率增加有关(粗发生率分别为3.9/1 000人年 vs 1.8/1 000人年,风险比2.08,95%置信区间1.83~2.36),但在考虑了混杂因素后,该估计值降至0值(风险比1.02,95%置信区间0.85~1.23)。第2个队列中包括32 336例GLP-1受体激动药使用者(中位随访时间1.2年)和96 212例SGLT-2抑制药使用者(中位随访期1.2年)。在粗分析中,与SGLT-2抑制药相比,GLP-1受体激动药的使用与自杀风险增加相关(粗发病率为4.3/1 000人年 vs 2.7/1 000人年,风险比1.60,95%置信区间1.37~1.87),但在考虑混杂因素后则不相关(0.91,95%置信区间0.73~1.12)。当对2组人群分别分析自杀意念、自残和自杀时,也观察到类似的结果。

该研究提示,与使用DPP-4抑制药或SGLT-2抑制药相比,2型糖尿病患者使用GLP-1受体激动药与自杀风险增加无关。