

## miR-126过表达和ADAM9基因沉默对胃癌SGC-7901细胞生物学行为的影响及其机制

魏海峰, 倪志强, 魏雁虹, 王起来, 李首庆, 马寅芙, 谭岩, 方艳秋  
(吉林省人民医院生物治疗与基因诊断重点实验室, 吉林 长春 130021)

**[摘要]** **目的:** 探讨微小RNA-126 (miR-126) 过表达和解整联蛋白金属蛋白酶9 (ADAM9) 基因沉默对胃癌细胞生物学行为的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 体外培养人胃低分化腺癌SGC-7901细胞和人正常胃黏膜上皮NGEC细胞, 提取细胞中总RNA, 采用实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 法检测2种细胞中miR-126和ADAM9 mRNA表达水平。将处于对数生长期的SGC-7901细胞分为miR-126过表达组(miR-126-OE组)和ADAM9基因沉默组(ADAM9 siRNA组), 以Lipofectamine™ 2000为载体分别转染miR-126模拟物(miR-126 mimics)和敲低ADAM9的RNA寡核苷酸, 并设置相应的阴性对照组。采用噻唑蓝(MTT)法检测各组细胞增殖活性, 细胞划痕实验检测各组细胞迁移率, Transwell小室实验检测各组细胞的迁移细胞数和侵袭细胞数, Western blotting法检测各组细胞中E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白和波形蛋白表达水平。TargetScan网站预测miR-126的靶基因并通过双荧光素酶报告基因实验验证miR-126和ADAM9的靶向调控关系, 采用RT-qPCR法和Western blotting法检测转染miR-126 mimics后SGC-7901细胞中ADAM9 mRNA和蛋白表达水平。**结果:** RT-qPCR法检测, 与人正常胃黏膜上皮NGEC细胞比较, 胃癌SGC-7901细胞中miR-126表达水平明显降低( $P < 0.05$ ), 而ADAM9 mRNA表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。MTT法检测, SGC-7901细胞过表达miR-126或沉默ADAM9基因48和72 h后, 与相应阴性对照组比较, miR-126 OE组和ADAM9 siRNA组细胞增殖活性均明显降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。细胞划痕实验检测, 与相应阴性对照组比较, 48 h后miR-126 OE组和ADAM9 siRNA组细胞迁移率明显降低( $P < 0.05$ )。Transwell小室实验检测, 与相应阴性对照组比较, miR-126 OE组和ADAM9 siRNA组迁移细胞数和侵袭细胞数明显减少( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。Western blotting法检测, 与相应阴性对照组比较, miR-126-OE组和ADAM9 siRNA组细胞中E-钙黏蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 而N-钙黏蛋白和波形蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。靶基因预测, ADAM9的3'-UTR含有与miR-126-3p互补的核苷酸序列。双荧光素酶报告基因实验, ADAM9是miR-126靶向负调控的下游基因。SGC-7901细胞转染miR-126 mimics 48 h后, 与mimics NC组比较, miR-126 OE组细胞中ADAM9 mRNA和蛋白表达水平均明显降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。**结论:** 胃癌SGC-7901细胞中miR-126低表达而ADAM9基因高表达。miR-126过表达可抑制胃癌SGC-7901细胞增殖活性、迁移和侵袭能力, 其机制可能与miR-126靶向负调控ADAM9并抑制胃癌细胞的上皮-间质转化(EMT)进程有关。

**[关键词]** 胃肿瘤; 微小RNA-126; 靶基因; 解整联蛋白金属蛋白酶9; 上皮-间质转化

**[中图分类号]** R735.2 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2023-03-23

**[基金项目]** 吉林省科技厅自然科学基金项目(20200201528JC, 20200201572JC); 吉林省卫健委卫生健康科技能力提升项目(2021JC056, 2021JC057)

**[作者简介]** 魏海峰(1978—), 男, 吉林省长春市人, 副研究员, 医学博士, 主要从事肿瘤基础与临床方面的研究。

**[通信作者]** 方艳秋, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: yq.fang@163.com)

## Effects of miR-126 over-expression and ADAM9 gene silencing on biological behavior of gastric cancer SGC-7901 cells and their mechanisms

WEI Haifeng, NI Zhiqiang, WEI Yanhong, WANG Qilai, LI Shouqing, MA Yinfu,  
TAN Yan, FANG Yanqiu

(Key Laboratory of Biotherapy and Gene Diagnosis, People's Hospital, Jilin Province, Changchun  
130021, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the effects of microRNA-126 (miR-126) over-expression and disintegrin and metalloproteinase 9 (ADAM9) gene silencing on the biological behavior of the gastric cancer cells, and to clarify the mechanism. **Methods:** The human poorly differentiated gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells and human normal gastric mucosa epithelial NPEC cells were cultured *in vitro*. The total RNA was extracted from the cells, and the expression levels of miR-126 and ADAM9 mRNA in both types of cells were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method. The SGC-7901 cells at logarithmic growth phase were divided into miR-126 over-expression group (miR-126-OE group) and ADAM9 gene silencing group (ADAM9 siRNA group). The transfection with miR-126 mimics (miR-126) mimics and ADAM9 RNA oligonucleotides were conducted by Lipofectamine™ 2000, and the corresponding negative control group was established; MTT assay was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups; cell wound assay was used to detect the migration rate of the cells in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the the numbers of migration and invasion cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of E-cadherin, N-cadherin, and vimentin proteins in the cells in various gorups. The miR-126 target genes were predicted by TargetScan website, and the targeting regulatory relationship between miR-126 and ADAM9 was confirmed by dual-luciferase reporter assay. The expression levels of ADAM9 mRNA and protein in the SGC-7901 cells after transfected with miR-126 mimics were detected by RT-qPCR and Western blotting methods. **Results:** The RT-qPCR results showed that compared with human normal gastric mucosa epithelial NPEC cells, the expression level of miR-126 in the gastric cancer SGC-7901 cells was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), while the expression level of ADAM9 mRNA was significantly increased ( $P < 0.05$ ). The MTT assay results showed that after 48 and 72 h of over-expressing miR-126 or silencing the ADAM9 gene in the SGC-7901 cells, compared with the corresponding negative control group, the proliferation activities of the cells in both miR-126-OE and ADAM9 siRNA groups were significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The cell wound assay results indicated that compared with the corresponding negative control group, the migration rates of the cells in both miR-126 OE and ADAM9 siRNA groups 48 h after transfection were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The Transwell chamber assay results showed that the numbers of migration and invasion cells in both miR-126-OE and ADAM9 siRNA groups were significantly lower than those in corresponding negative control group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The Western blotting method results showed that compared with the corresponding negative control groups, the expression level of E-cadherin protein in the cells in miR-126-OE and ADAM9 siRNA groups were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), while the expression levels of N-cadherin and vimentin proteins were significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The target prediction results showed that the 3'-UTR of ADAM9 contains nucleotide sequences complementary to miR-126-3p. The dual-luciferase reporter assay results showed that ADAM9 was a downstream target gene negatively regulated by miR-126. Compared with mimics

NC group, the expression levels of ADAM9 mRNA and protein in the SGC-7901 cells after transfected with miR-126 mimics for 48 h were decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The gastric cancer SGC-7901 cells are characterized by low expression of miR-126 and high expression of ADAM9 gene. Over-expression of miR-126 can inhibit the proliferative activity, migration, and invasion capabilities of the gastric cancer SGC-7901 cells; the mechanism may be related to the negative regulation of ADAM9 by miR-126 and the inhibition of epithelial-mesenchymal transition (EMT) process in the gastric cancer cells.

**KEYWORDS** Gastric neoplasm; MicroRNA-126; Target gene; A disintegrin and metalloprotease 9; Epithelial-mesenchymal transition

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,在我国恶性肿瘤中位于第2位。早期胃癌多无症状,一旦出现症状,多为中晚期,晚期胃癌细胞的侵袭转移是造成胃癌患者死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤转移过程的重要环节,并受多种因素调控。微小RNA(microRNA, miRNA)可正负调控EMT相关基因的表达,与肿瘤细胞EMT密切相关<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3-4]</sup>表明:微小RNA-126(miRNA-126, miR-126)在胃癌组织及患者血清中表达水平降低,且与肿瘤大小、临床分期、组织分化程度和远处转移等有关。肿瘤微环境中的miR-126作为一种抑癌因子维持着肿瘤稳定,其表达水平下调能活化与肿瘤生长及转移相关的信号通路,进而导致肿瘤转移和复发。其中,miR-126-3p和miR-126-5p是互补的姐妹链,来自于相同的发夹RNA前体,本文作者前期通过生物信息学网站检索,发现两者可能的靶基因列表中均包含解整联蛋白金属蛋白酶9(a disintegrin and metalloprotease 9, ADAM9)。相关研究<sup>[5-7]</sup>表明:在多种恶性肿瘤中均发现ADAM9呈高表达,并与肿瘤进展、转移和不良预后相关。GAO等<sup>[8]</sup>发现ADAM9在胃癌的增殖和侵袭中发挥重要作用,ADAM9可能是晚期胃癌的有效治疗靶点。miR-126和ADAM9均在肿瘤预测及预后预测中表现出良好的临床应用前景,但在胃癌转移复发中,miR-126调控ADAM9的具体机制尚未完全阐明。本研究观察过表达miR-126和沉默ADAM9基因对胃癌SGC-7901细胞增殖、迁移和侵袭等生物学行为的影响,明确miR-126-3p与ADAM9的靶向调控关系,探讨miR-126和ADAM9在胃癌转移复发中的作用,并从抑制EMT的角度阐明其可能的作用机制,为胃癌的诊疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、主要试剂和仪器 人胃低分化腺癌

SGC-7901细胞由东北师范大学遗传与细胞研究所馈赠,保存于吉林省人民医院中心实验室,人正常胃黏膜上皮NGEC细胞购自上海盈湾生物科技有限公司,miR-126-3p模拟物(miR-126 mimics)及阴性对照Cel-miR-67模拟物(Cel-miR-67 mimics)购自上海百奥迈科生物技术有限公司,ADAM9 RNA寡核苷酸(RNA oligo,化学合成法)及引物委托上海吉玛基因公司设计并合成,Lipofectamine™ 2000购自法国Polyplus公司,DMEM高糖培养基、5%和10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Hyclone公司,1%青霉素-链霉素双抗购自北京全式金有限公司,RIPA裂解液和双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,TRIzol试剂购自北京田根有限公司,逆转录试剂盒购自美国Promega公司,荧光定量检测试剂SYBR Green Master购自瑞士Roche公司,Transwell小室购自美国Corning公司,Matrigel基质胶购自美国BD公司,ADAM9、E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白和波形蛋白一抗及二抗均购自美国CST公司。高速低温离心机购自美国Thermo公司,PCR扩增仪(型号:9700)及荧光定量PCR仪(型号:7500 Fast)购自美国ABI公司,酶标仪(型号:MULTISKAN MK3)购自美国Thermo公司,电泳仪(型号:ELITE 300)购自美国Wealtec公司,全自动化学发光图像分析系统(型号:5500 Multi)购自上海Tanon公司。

**1.2 细胞培养** 采用含10% FBS和1%青霉素-链霉素双抗的DMEM高糖培养基于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下孵育细胞。当细胞融合度达到80%~100%时消化传代。选用对数生长期的细胞按照实验要求消化并用所需细胞数传代。

**1.3 细胞转染及分组** 按照Lipofectamine™ 2000说明书进行操作,用于转染的细胞,在转染前1d选取处于对数生长期且生长状态良好的细胞,胰酶

消化, 以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞的密度接种至 6 孔细胞培养板中。转染当天细胞丰度可达 60%~70%。miR-126 过表达组 (miR-126-OE 组) 细胞转染 miR-126 mimics, 每孔 5  $\mu\text{L}$  (终浓度为  $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), ADAM9 RNA 干扰组 (ADAM9 siRNA 组) 转染敲低 ADAM9 的 RNA oligo (实验步骤参照 siRNA 试剂说明书), 并设立相应的阴性对照组 (mimics NC、siRNA NC), 分别转染 Cel-miR-67 mimics 和 RNA 干扰无关序列。转染后 48 h, 留取细胞, 提取 RNA 或蛋白用于后续实验。

**1.4 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 法检测细胞中 miR-126 和 ADAM9 mRNA 表达水平** 细胞转染 24 h 后, 采用 TRIzol (100  $\mu\text{L}$ /孔) 提取细胞总 RNA, 然后用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 采用 SYBR Green 掺入法进行 RT-qPCR 反应, 引物序列见表 1。反应条件:  $95^\circ\text{C}$ 、5 min;  $95^\circ\text{C}$ 、15 s,  $60^\circ\text{C}$ 、15 s,  $72^\circ\text{C}$ 、30 s, 40 个循环。ADAM9 以 GAPDH 为内参, miR-126 以 U6 为内参, 内参和目的基因同时扩增, 每组设 3 个重复, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算目的基因表达水平。

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences of PCR

Target gene	Primer sequence
ADAM9	F: 5'-GGAAGAGTGTGACTGTGGTAC-3' R: 5'-CCTCGGCATAAAGTACCTCC-3'
Hsa-miR-126 stem-loop RT primer	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACCGCATT-3'
MiR-126-3p	F: 5'-GTCTCGTACCGTGAGTAAT-3' R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6	F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3' R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
GAPDH	F: 5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3' R: 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'

**1.5 MTT 法检测各组细胞增殖活性** 取对数生长期的胃癌细胞株制成细胞悬液, 采用完全培养基将细胞浓度稀释为每毫升  $10 \times 10^5$  个细胞, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 继续培养 24 h 至细胞完全贴壁后, 根据需要采用不同条件对细胞进行处理, 间隔 24、48 和 72 h 后每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT, 4 h 后将培养基吸去, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO, 震荡 5 min 后置于酶标自动分析仪, 在 490 nm 波长下测定吸光度 (A) 值, 设置 3 个平行孔, 取平均值, 以 A (490) 值代表细胞增殖活性。

**1.6 细胞划痕实验检测各组细胞迁移率** 单细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板, 次日细胞丰度达 60%~70% 时进行细胞转染。转染后 4~6 h 细胞换液前, 以 10  $\mu\text{L}$  枪头于 6 孔细胞培养板中央十字划线, 轻晃培养板, 吸弃培养液及掉落细胞, 细胞换液; 分别于划痕 0、24 和 48 h 时在显微镜下拍照; 采用 Image J 软件测量划痕处细胞划痕宽度, 计算细胞迁移率, 细胞迁移率 = (0 h 划痕宽度 - 24 h 或 48 h 时划痕宽度) / 0 h 划痕宽度  $\times 100\%$ 。

**1.7 Transwell 小室实验检测各组细胞的迁移细胞数和侵袭细胞数** 细胞接种在 Transwell 小室的微孔膜上, 迁移实验不加 Matrigel 基质胶, 仅计算穿膜细胞数。侵袭实验的操作方法:  $4^\circ\text{C}$  过夜融化 Matrigel 基质胶, 并用预冷的不含血清的 DMEM 培养基按 1:3 稀释, 使其终浓度达到  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 将 Transwell 小室 (8.0  $\mu\text{m}$  孔径聚碳酸酯膜) 放置于 24 孔细胞培养板上, 并加入 100  $\mu\text{L}$  稀释的 Matrigel,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h 使胶凝固; 采用含 5% FBS 的 DMEM 培养基制备待实验细胞悬液, 计数, 加入 100  $\mu\text{L}$  含  $5 \times 10^4$  个细胞的细胞悬液于小室上室中, 并加 600  $\mu\text{L}$  含 10% FBS 的 DMEM 培养基于 Transwell 小室的下室; 将细胞培养板置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞孵育箱培养 48 h; 从 24 孔细胞培养板中取出 Transwell 小室, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 3~5 min; 用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, PBS 缓冲液洗 3 次, 每次 3~5 min; 棉签小心除去微孔滤膜上层未穿膜的细胞。0.5% Triton X-100 透化 5 min, PBS 缓冲液洗 3 次, 每次

3~5 min; 苏木精染细胞核 3 min, 用自来水冲洗 5 min; 弱氨水浸泡 10 s, 用自来水冲洗 3 min; 伊红染细胞质 5 min, 用自来水洗净; 将小室微孔膜的下室面置于倒置显微镜( $\times 10$ )下拍照, 随机选取 5 个视野, 采用 Image J 软件计算细胞数。实验重复 3 次。

**1.8 Western blotting 法检测各组细胞中 ADAM9 和 EMT 相关蛋白表达水平** 细胞转染 48 h 后, 加入适量 RIPA 裂解液提取细胞的总蛋白, 然后采用 BCA 法测定蛋白浓度, 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶分离蛋白, 然后将蛋白转移至 PVDF 膜上, 然后用 5% 脱脂牛奶进行封闭后, 分别加入 ADAM9、E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白和波形蛋白一抗(均 1:1 000 稀释), 4℃过夜, 第 2 天用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h, 最后用显影仪显影, 拍照。图片采用 Image J 软件进行灰度值分析, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

**1.9 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-126 与 ADAM9 的靶向调控关系** 登录 TargetScan 生物信息学数据库网站(<https://www.targetscan.org>), 物种选择“human”, 输入 miRNA 名称“miR-126-3p”, 预测 miR-126 的靶基因。通过双荧光素酶报告基因实验进一步验证 ADAM9 是否为 miR-126 的靶基因。构建 ADAM9 靶点序列的荧光素酶报告基因重组质粒及突变型的报告基因重组质粒(pmirGLO-ADAM9 3'-UTR-WT 和 pmirGLO-ADAM9 3'-UTR-MUT), 将荧光重组质粒与 miR-126 mimics 共转入 24 孔细胞培养板培养的 HEK293T 细胞中, 37℃培养 48 h, 加入细胞裂解液裂解细胞, 收集裂解液, 取上清液作为待测液加入 96 孔细胞培养板。分别在加入萤火虫荧光素酶检测工作液 I 和海肾荧光素酶检测工作液 II 后采用多功能酶标仪检测荧光值, 计算荧光素酶表达活性。荧光素酶表达活性=萤火虫荧光素酶检测值/海肾荧光素酶检测值。

**1.10 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。各组细胞 A 值, 细胞迁移率, 迁移细胞数和侵袭细胞数, miR-126, ADAM9 mRNA 和蛋白表达水平, E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白和波形蛋白表达水平均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示,

2 组间样本均数比较采用两独立样本 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组细胞中 miR-126 表达水平和 ADAM9 mRNA 及蛋白表达水平** RT-qPCR 法检测结果显示: 与人正常胃黏膜上皮 N-GEC 细胞中 miR-126 表达水平 ( $1.000 \pm 0.093$ ) 比较, 胃癌 SGC-7901 细胞中 miR-126 表达水平 ( $0.461 \pm 0.144$ ) 明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与人正常胃黏膜上皮 N-GEC 细胞中 ADAM9 mRNA 表达水平 ( $0.144 \pm 0.056$ ) 比较, 胃癌 SGC-7901 细胞中 ADAM9 mRNA 表达水平 ( $0.871 \pm 0.092$ ) 明显升高 ( $P < 0.05$ )。见图 1A。转染 miR-126 mimics 48 h 后, 与 mimics NC 组比较, miR-126-OE 组胃癌 SGC-7901 细胞中 miR-126 表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ )。见图 1B。Western blotting 法检测结果显示: 转染 ADAM9 小干扰 RNA 序列后, SGC-7901 细胞中 ADAM9 蛋白表达被抑制。见图 1C。

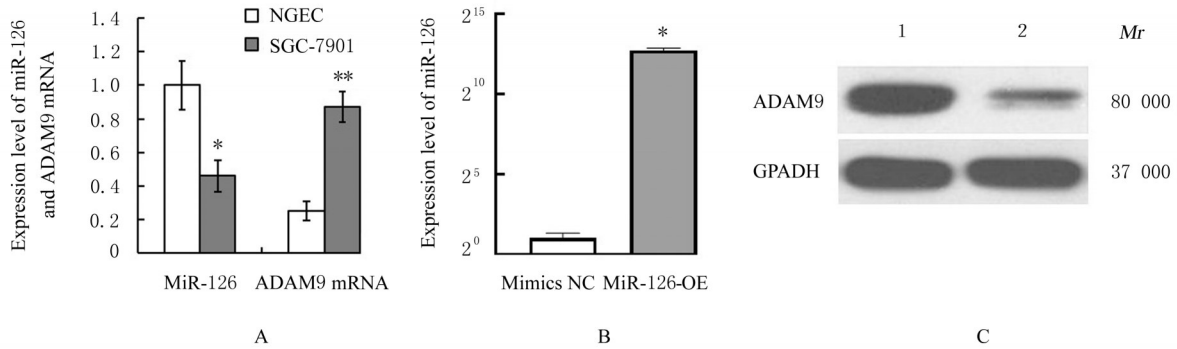
**2.2 各组细胞增殖活性** MTT 法检测结果显示: 过表达 miR-126 或沉默 ADAM9 基因处理 SGC-7901 细胞 48 和 72 h 后, 与相应阴性对照组比较, miR-126-OE 组和 ADAM9 siRNA 组细胞增殖活性明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 2。

**2.3 各组 SGC-7901 细胞的细胞迁移率** 细胞划痕实验检测结果显示: SGC-7901 细胞划痕 48 h 后, 与相应阴性对照组比较, miR-126-OE 组和 ADAM9 siRNA 组 SGC-7901 细胞迁移率明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

**2.4 各组细胞的迁移细胞数和侵袭细胞数** Transwell 小室实验检测结果显示: 与相应阴性对照组比较, miR-126-OE 组和 ADAM9 siRNA 组迁移细胞数及侵袭细胞数明显减少 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 4。

**2.5 各组细胞中 EMT 相关蛋白表达水平** Western blotting 法检测结果显示: 与相应阴性对照组比较, miR-126-OE 组和 ADAM9 siRNA 组胃癌 SGC-7901 细胞中 E-钙黏蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而 N-钙黏蛋白和波形蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见图 2。

**2.6 miR-126-3p 靶基因预测** TargetScan 网站靶基因预测结果显示: ADAM9 为 miR-126-3p 的靶基因, ADAM9 的 3'-UTR 含有与 miR-126-3p 互补的



A: Expression levels of miR-126 and ADAM9 mRNA in different types of cells (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with NGEC group); B: Expression level of miR-126 after transfected with miR-126 mimics (\* $P < 0.01$  compared with mimics NC group); C: Electrophoregram of expression of ADAM9 protein(Lane 1: SiRNA NC group; Lane 2: ADAM9 siRNA group).

图1 各组细胞中 miR-126 和 ADAM9 mRNA 表达水平及 ADAM9 蛋白表达电泳图

Fig. 1 Expression levels of miR-126 and ADAM9 mRNA and electrophoregram of expression of ADAM9 protein in cells in various groups

表2 不同时间点各组 SGC-7901 细胞增殖活性

Tab. 2 Proliferation activities of SGC-7901 cells in various groups at different time points ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	Proliferation activity of SGC-7901 cells			
	(t/h)0	24	48	72
Mimics NC	0.15±0.03	0.34±0.08	0.57±0.11	1.26±0.12
MiR-126-OE	0.13±0.04	0.23±0.07	0.28±0.12*	0.85±0.13*
SiRNA NC	0.16±0.02	0.36±0.04	0.73±0.14	1.79±0.25
ADAM9 siRNA	0.17±0.06	0.31±0.05	0.40±0.09 <sup>△</sup>	0.79±0.11 <sup>△△</sup>

\* $P < 0.05$  compared with mimics NC group; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$  compared with siRNA NC group.

表3 不同时间点各组 SGC-7901 细胞迁移率

Tab. 3 Migration rates of SGC-7901 cells in various groups at different time points ( $n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$ )

Group	Migration rate of SGC-7901 cells	
	(t/h) 24	48
Mimics NC	59.2±12.4	89.6±15.4
MiR-126-OE	41.7±8.6	53.1±12.7*
SiRNA NC	60.4±9.5	91.6±15.8
ADAM9 siRNA	43.5±11.3	46.9±9.2 <sup>△</sup>

\* $P < 0.05$  compared with mimics NC group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with siRNA NC group.

核苷酸序列。见图3。

2.7 miR-126 与 ADAM9 的靶向调控关系 成功构建 pmir-ADAM9 3'-UTR-WT 与 pmir-ADAM9 3'-UTR-MUT 表达载体, 载体序列及其与 miR-126-3p 的结合位点见图4。双荧光素酶报告基因实验检测结果显示: 与 mimics NC 组比较, 转染

表4 各组 SGC-7901 细胞的迁移细胞数和侵袭细胞数

Tab. 4 Numbers of migration and invasion SGC-7901 cells in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

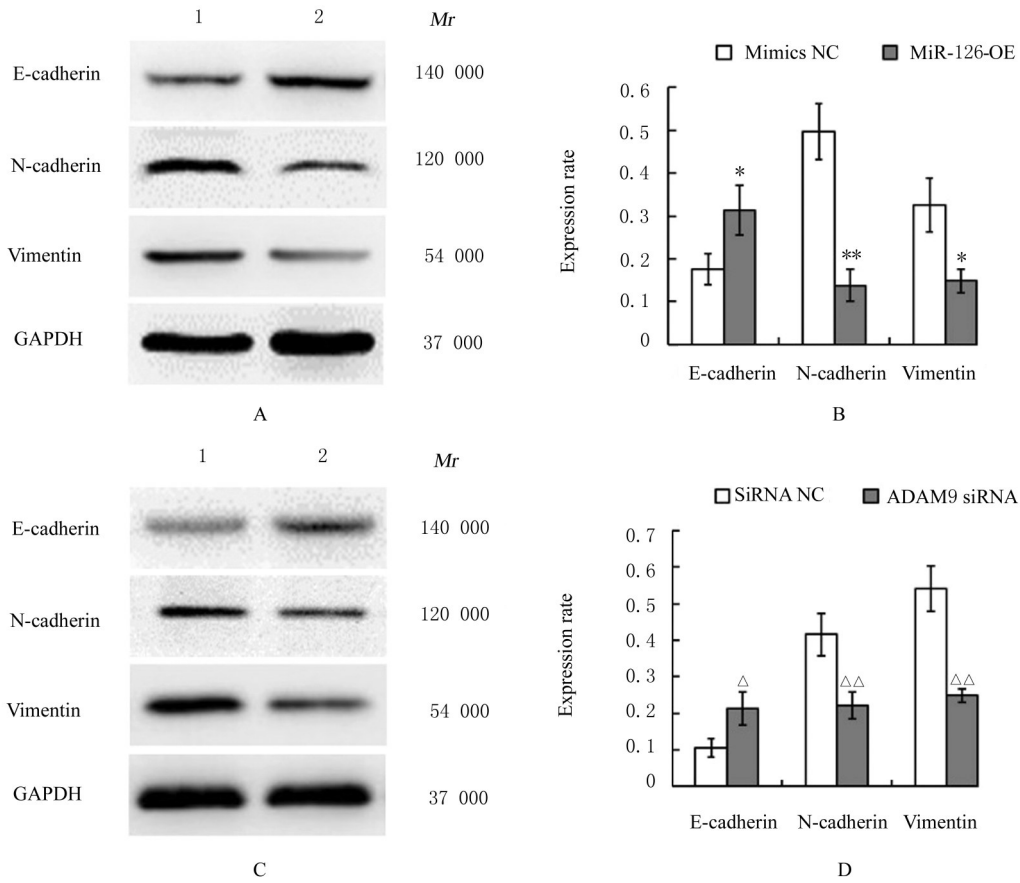
Group	Number of migration	Number of invasion
	cells	cells
Mimics NC	163.24±21.47	125.41±18.18
MiR-126-OE	103.15±16.49*	76.64±10.29*
SiRNA NC	147.91±19.15	113.24±14.29
ADAM9 siRNA	98.64±13.28 <sup>△</sup>	62.47±8.26 <sup>△△</sup>

\* $P < 0.05$  compared with mimics NC group; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$  compared with siRNA NC group.

pmir-ADAM9 3'-UTR-WT 后 miR-126 OE 组细胞荧光素酶活性明显降低 ( $P < 0.05$ ), 而转染 pmir-ADAM9 3'-UTR-MUT 后 miR-126 OE 组细胞荧光素酶活性差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图5A。在 SGC-7901 细胞中转染 miR-126 mimics 48 h 后, RT-qPCR 法检测结果显示: 与 mimics NC 组比较, miR-126 OE 组细胞中 ADAM9 mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。见图5B。Western blotting 法检测结果显示: 与 mimics NC 组比较, miR-126 OE 组细胞中 ADAM9 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图5C和5D。

### 3 讨论

miR-126 通常在正常组织中高表达、在多种肿瘤组织中低表达, 其可通过调控多种信号通路相关蛋白的表达参与肿瘤细胞的增殖、迁移以及血管生成, 在恶性肿瘤的发生发展中起重要的作用<sup>[9-11]</sup>。



A: Electrophoregram of expressions of EMT related proteins ( Lane 1: Mimics NC group; Lane 2: MiR-126-OE group) ; C: Electrophoregram of expressions of EMT related proteins ( Lane 1: SiRNA NC group; Lane 2: ADAM9 siRNA group) ; B, D: Histograms of expressions of EMT related proteins (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with mimics NC group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  compared with siRNA NC group).

图2 各组SGC-7901细胞中E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白和波形蛋白表达电泳图和直条图

Fig. 2 Electrophoregrams and histograms of expressions of E-cadherin, N-cadherin, and vimentin proteins in SGC-7901 cells in various groups

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 780-786 of ADAM9 3' UTR	5' ...AAUUUAUAAGCUUUAAGGUACGAA...
hsa-miR-126-3p.1	3' GCGUAAUUAUGAGUG--CCAUGCU

图3 TargerScan网站预测的miR-126-3p与ADAM9 3'-UTR区的互补结合位点

Fig. 3 Complementary binding sites between miR-126-3p and ADAM9 3'-UTR predicted by TargerScan website

Site : 780-786 of ADAM9 3'UTR

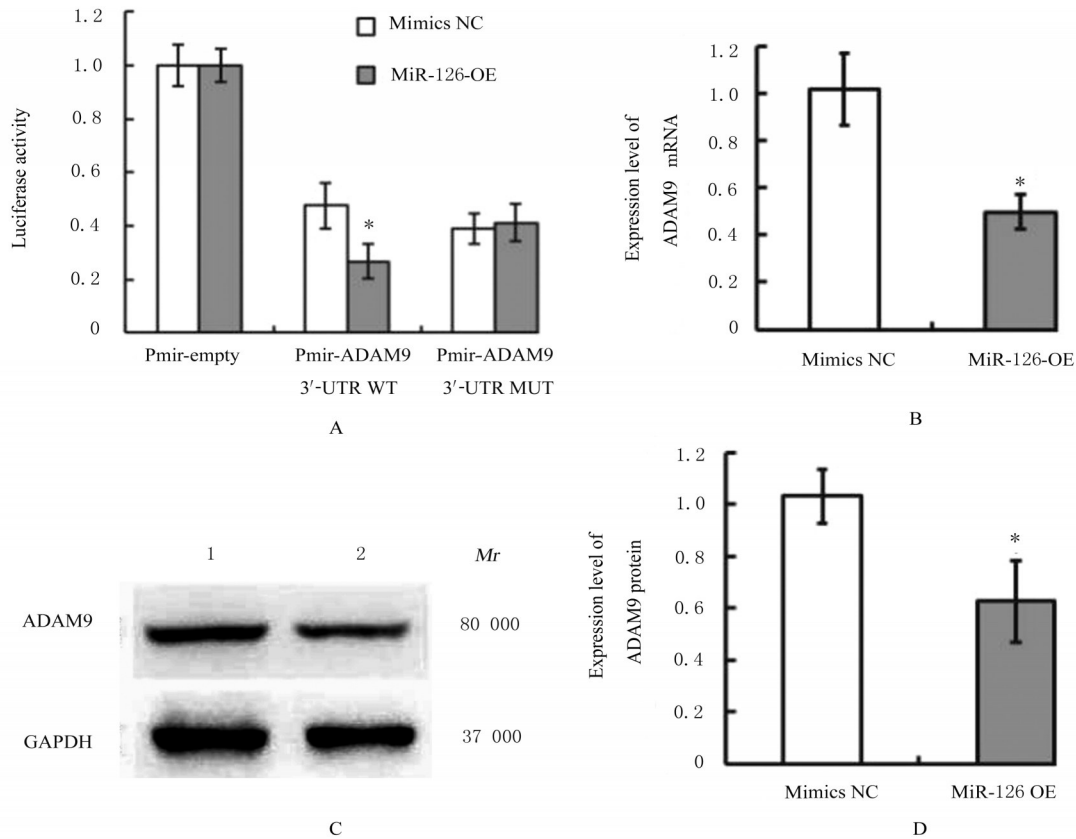
```

3' UTR WT      5'...AAUUUAUAAGCUUUAAGGUACGAA...
                |||||
has-miR-126-3p 3'-GCGUAAUUAUGAGUG--CCAUGCU
3' UTR MUT     5'...AAUUUAUAAGCUUUAACGUA...
    
```

图4 ADAM9 3'-UTR表达载体序列

Fig. 4 Sequences of ADAM9 3'-UTR expression vector

相关研究<sup>[12-13]</sup>表明:胃癌组织和肿瘤微环境中低表达的miR-126参与了胃癌的发生发展。本课题组前期研究<sup>[14]</sup>显示:miR-126在胃癌组织中较癌旁组织表达降低,且与肿瘤远处转移和淋巴结转移具有显著相关性,提示miR-126可能在胃癌的复发及转移中发挥重要作用。本研究结果显示:与人正常胃黏膜上皮NGEC细胞比较,在胃癌SGC-7901细



A: Luciferase activity of cells in two groups detected by dual-luciferase reporter assay ( $*P < 0.05$  vs mimics NC group); B: Expression level of ADAM9 mRNA detected by RT-qPCR method ( $*P < 0.01$  vs mimics NC group); C: Electrophoregram of expression of ADAM9 protein detected by Western blotting method (Lane 1: Mimics NC group; Lane 2: MiR-126-OE group); D: Histogram of expression level of ADAM9 protein ( $*P < 0.05$  compared with mimics NC group).

图5 双荧光素酶报告基因实验结果

Fig. 5 Results of double luciferase reporter gene experiment

胞中 miR-126 的表达水平明显降低, miR-126 过表达可显著抑制胃癌 SGC-7901 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 进一步证实了 miR-126 是一种抑癌性 miRNA。分析其原因可能是: miR-126 表达下调甚至缺失, 失去对相应癌基因的调控和监视作用, 使上述癌基因表达水平升高, 从而诱发或促进肿瘤的发展。miR-126 调节靶基因参与胃癌进展的相关研究较多, 如 miR-126 可靶向调节高尔基磷蛋白 3 (golgiphosphoprotein3, GOLPH3) 介导 mTOR 相关通路发挥作用<sup>[12]</sup>, 或通过抑制原癌基因 K-ras 和基质金属蛋白酶 7 (matrix metalloproteinase 7, MMP7) 的表达参与肿瘤的进展<sup>[13]</sup>。miRNA 在调节过程中的主要优势之一在于其能够同时调节多个靶基因的表达, 从而实现一对多的调节模式。因此, miR-126 在胃癌治疗中具有潜在的优势。然而, miR-126 参与胃癌发生发展的确切调控机制尚未完全阐明。

ADAM9 是多功能、多结构域 1 型跨膜蛋白 ADAM 家族的成员之一, 主要通过用于黏附的分解蛋白结构域和用于脱落多种细胞表面蛋白的金属蛋白结构域参与多种生理功能<sup>[15-16]</sup>。ADAM9 在多种恶性肿瘤中高表达, 包括非小细胞肺癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌和结直肠癌等, 在正常组织中表达有限<sup>[17-19]</sup>, 并与肿瘤侵袭性和不良预后有关<sup>[7]</sup>。ADAM9 可通过蛋白水解或非蛋白水解途径促进肿瘤的进展、治疗抗性和肿瘤转移。本课题组前期研究<sup>[14]</sup> 结果显示: ADAM9 在胃癌组织中高表达, 且与肿瘤分化程度和淋巴结转移具有显著相关性。本研究设计构建了 ADAM9 小干扰 RNA, 结果显示: 沉默 ADAM9 基因可抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 再一次通过体外实验证明 ADAM9 作为癌基因参与了胃癌的发生发展。ADAM9 已成为目前非常有应用前景的抗癌新靶标之一, 虽然直接靶向 ADAM9 尚未开展临床应用,

但间接作用的研究已成为当今的研究热点之一。如LIN等<sup>[7]</sup>在进行白藜芦醇的抗癌作用研究中证实:白藜芦醇可通过调节ADAM9抑制癌细胞在肺癌和食管癌细胞中的迁移及存活。索拉非尼是一种多受体酪氨酸激酶抑制剂,临床上用于治疗肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),其可以抑制ADAM9 mRNA和蛋白表达,并导致肿瘤组织中膜型形式(membrane MICA, mMICA)的上调,从而增强自然杀伤细胞对HCC的活性<sup>[20]</sup>。瑞戈非尼是一种多激酶抑制剂,对索拉非尼耐药的HCC患者有效,并显著降低ADAM9和ADAM10的mRNA和蛋白表达水平,以促进mMICA在HCC细胞膜上的积累<sup>[21]</sup>。肿瘤微环境是无数信号分子形成的复杂网络,其中的microRNAs正成为新兴信号调节因子。能够靶向调节ADAM9的miRNA多达十几种,主要包括miR-223、miR-498、miR-182、miR-502、miR-921、miR-488和miR-129等,这些miRNA能通过与其靶基因3'-UTR的相互作用而降低靶基因mRNA稳定性或转录后抑制靶蛋白的合成,从而在细胞增殖、分化、代谢、死亡和发育过程中发挥重要作用。

本课题组前期研究<sup>[14]</sup>结果表明:ADAM9表达阳性的胃癌组织中miR-126表达水平偏低,推测两者间可能存在负相关调节作用。通过查阅TargetScan网站,发现ADAM9的3'-UTR含有与miR-126-3p互补的核苷酸序列,因此ADAM9可能为miR-126的靶基因。为了验证miR-126与ADAM9的靶向调控关系,本研究构建了双荧光素酶报告基因载体质粒的野生型和突变型,通过分析比较荧光素酶的活性,证实了miR-126可与ADAM9的3'-UTR特异性结合。在SGC-7901细胞转染miR-126 mimics后,随着miR-126表达上调,ADAM9 mRNA和蛋白表达均受到抑制,表明miR-126可直接负调控ADAM9,发挥相应生物学作用,这与前期临床研究<sup>[14]</sup>结果一致。

miRNA可以通过负性调控EMT相关基因的表达,在肿瘤转移中发挥重要作用<sup>[22-23]</sup>。为了进一步探讨miR-126和ADAM9影响胃癌细胞生物学行为的机制,本研究通过细胞划痕实验和Transwell小室实验证实:过表达miR-126和ADAM9基因沉默均可抑制胃癌细胞的侵袭及转移能力。进一步通过Western blotting法证实:过表达miR-126和ADAM9基因沉默可促进胃癌SGC-7901细胞中

E-钙黏蛋白表达,下调N-钙黏蛋白和波形蛋白表达,具有阻抑胃癌细胞EMT进程的作用,可能是其影响胃癌细胞迁移和侵袭的作用机制之一。ADAM9是近年来被发现参与调控EMT的重要基因。研究<sup>[24-26]</sup>表明:ADAM9的表达与白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)和Snail的表达呈正相关关系,是IL-6诱导的HCC细胞迁移和侵袭的重要介质,其表达还可被药物或miRNAs调控,激活相关信号通路参与恶性肿瘤的EMT。ADAM9还可为内皮细胞增殖和迁移创造空间,促进肿瘤血管生成,同时也为肿瘤细胞的生长和转移提供了有利条件。因此miR-126/ADAM9/EMT可能是胃癌发生发展中的重要途径之一。miR-126-3p和miR-126-5p的靶基因众多,其功能也涉及肿瘤发生发展的多个方面,ADAM9表达也受多种miRNAs的靶向调节,因此,对于miR-126和ADAM9参与调控胃癌EMT的具体机制还需要开展广泛深入的研究。

综上所述,胃癌SGC-7901细胞中miR-126低表达而ADAM9基因高表达。miR-126过表达和ADAM9基因沉默均可抑制胃癌SGC-7901细胞增殖活性、迁移和侵袭能力,ADAM9是miR-126的直接靶基因,过表达miR-126可靶向负调控ADAM9并阻抑胃癌细胞EMT进程,延缓胃癌的进展。因此,上调miR-126表达的药物或靶向ADAM9的分子治疗在胃癌的治疗和抗复发转移方面具有良好的临床应用前景。

#### 利益冲突声明:

所有作者均声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

魏海峰负责实验设计和起草撰写文章,倪志强和魏雁虹负责数据采集整理;王起来、李首庆和马寅芙负责实验操作、数据处理与统计学分析;谭岩和方艳秋负责课题指导、论文审阅与修订。

#### [参考文献]

- [1] LI H Q, ZHANG H, ZHANG H J, et al. Survival of gastric cancer in China from 2000 to 2022: a nationwide systematic review of hospital-based studies [J]. *J Glob Health*, 2022, 12: 11014.
- [2] SI L H, YANG Z C, DING L, et al. Regulatory effects of lncRNAs and miRNAs on the crosstalk between autophagy and EMT in cancer: a new era for cancer treatment [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022, 148(3): 547-564.

- [3] 龚 瑜, 杨其昌, 袁荣华, 等. 胃癌组织与血清 miR-126 的表达及临床意义[J]. 癌变·畸变·突变, 2017, 29(4): 272-276, 283.
- [4] FENG R H, SAH B K, LI J F, et al. miR-126: an indicator of poor prognosis and recurrence in histologically lymph node-negative gastric cancer [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 23(3): 437-445.
- [5] HAOYUAN M A, YANSHU L I. Structure, regulatory factors and cancer-related physiological effects of ADAM9[J]. *Cell Adh Migr*, 2020, 14(1): 165-181.
- [6] CHANDRASEKERA P, PERFETTO M, LU C Y, et al. Metalloprotease ADAM9 cleaves ephrin-B ligands and differentially regulates Wnt and mTOR signaling downstream of Akt kinase in colorectal cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(8): 102225.
- [7] LIN Y S, HSIEH C Y, KUO T T, et al. Resveratrol-mediated ADAM9 degradation decreases cancer progression and provides synergistic effects in combination with chemotherapy[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(11): 3828-3837.
- [8] GAO H F, XU J J, QIAO F, et al. Depletion of hsa\_circ\_0000144 suppresses oxaliplatin resistance of gastric cancer cells by regulating miR-502-5p/ADAM9 axis[J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 2773-2787.
- [9] SOOFIYANI S R, HOSSEINI K, EBRAHIMI T, et al. Prognostic value and biological role of miR-126 in breast cancer[J]. *Microna*, 2022, 11(2): 95-103.
- [10] YU J, FAN Q Q, LI L L. The MCM3AP-AS1/miR-126/VEGF axis regulates cancer cell invasion and migration in endometrioid carcinoma [J]. *World J Surg Oncol*, 2021, 19(1): 213.
- [11] YANG Q Y, YU Q, ZENG W Y, et al. Killing two birds with one stone: miR-126 involvement in both cancer and atherosclerosis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2022, 26(17): 6145-6168.
- [12] 蒋莉萍, 赖铭裕, 蒋茂芹, 等. miR-126 与靶基因 GOLPH3 在胃癌中的表达及其机制 [J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(5): 623-627.
- [13] 杜 昕, 曲 泽, 赵选忠, 等. miRNA-126 和 K-Ras 及 MMP-7 在胃癌中的表达及其相关性分析 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2021, 35(1): 23-27.
- [14] 魏海峰, 倪志强, 王起来, 等. 人胃癌组织中微小 RNA-126 和解整合素-金属蛋白酶 9 的表达及其与临床病理参数的相关性 [J]. *中国医药*, 2023, 18(11): 1678-1682.
- [15] HAOYUAN M A, YANSHU L I. Structure, regulatory factors and cancer-related physiological effects of ADAM9[J]. *Cell Adh Migr*, 2020, 14(1): 165-181.
- [16] MYGIND K J, SCHWARZ J, SAHGAL P, et al. Loss of ADAM9 expression impairs  $\beta 1$  integrin endocytosis, focal adhesion formation and cancer cell migration [J]. *J Cell Sci*, 2018, 131(1): jcs205393.
- [17] 朱莉金, 罗 琰, 贾清玉, 等. ADAM9 在实体肿瘤生物学中的相关研究进展 [J]. *临床医学进展*, 2020(10): 2270-2280.
- [18] ORIA V O, LOPATTA P, SCHMITZ T, et al. ADAM9 contributes to vascular invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(2): 456-479.
- [19] UENO M, SHIOMI T, MOCHIZUKI S, et al. ADAM9 is over-expressed in human ovarian clear cell carcinomas and suppresses cisplatin-induced cell death [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(2): 471-482.
- [20] ZHOU C C, LIU J B, LI Y, et al. microRNA-1274a, a modulator of sorafenib induced a disintegrin and metalloproteinase 9 (ADAM9) down-regulation in hepatocellular carcinoma [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(12): 1828-1834.
- [21] OH S, PARK Y, LEE H J, et al. A disintegrin and metalloproteinase 9 (ADAM9) in advanced hepatocellular carcinoma and their role as a biomarker during hepatocellular carcinoma immunotherapy [J]. *Cancers*, 2020, 12(3): 745.
- [22] CHENG X S, SHEN T, LIU P, et al. miR-145-5p is a suppressor of colorectal cancer at early stage, while promotes colorectal cancer metastasis at late stage through regulating AKT signaling evoked EMT-mediated anoikis [J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 1151.
- [23] CHEN Y, FANG Y, LI L, et al. Exosomal miR-22-3p from mesenchymal stem cells inhibits the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of melanoma cells by regulating LGALS1 [J]. *Front Biosci*, 2022, 27(9): 275.
- [24] VAN KAMPEN J G M, VAN HOOIJ O, JANSEN C F, et al. miRNA-520f reverses epithelial-to-mesenchymal transition by targeting ADAM9 and TGFBR2 [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(8): 2008-2017.
- [25] DONG Y Y, WU Z F, HE M Y, et al. ADAM9 mediates the interleukin-6-induced Epithelial-Mesenchymal transition and metastasis through ROS production in hepatoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2018, 421: 1-14.
- [26] LE T T, HSIEH C L, LIN I H, et al. The ADAM9/UBN2/AKR1C3 axis promotes resistance to androgen-deprivation in prostate cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(1): 176-197.