

胃癌相关 miR-148a 靶向调控胃泌素受体 CCKBR

郭水龙^{1,2}, 朱圣韬^{1,2}, 李 鹏^{1,2,3}, 王拥军^{1,2,3}, 王 民^{1,2}, 邢 洁^{1,2},
郭庆东^{1,2}, 孙秀梅^{1,2}, 张澍田^{1,2,3}

(1. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050; 2. 消化疾病癌前病变北京市重点实验室, 北京 100050;
3. 北京市消化疾病中心, 北京 100050)

【摘要】 目的 研究胃癌相关 miR-148a 与胃泌素受体 CCKBR 的调控关系, 并分析其调控结合位点。**方法** 生物信息学预测人 CCKBR 3' UTR 上 miR-148a 的结合位点; 利用 PCR 扩增 miR-148a 前体构建真核表达载体; Northern Blot 检测 miR-148a 真核表达载体的表达; 构建 CCKBR 3' UTR 野生型和突变型荧光素酶报告载体, 并利用双荧光素酶活性分析检测分析 miR-148a 对 CCKBR 基因表达的调控和结合位点; Western Blot 检测 miR-148a 过表达对 CCKBR 蛋白表达的作用。**结果** 在人 CCKBR 3' UTR 上找到 3 个 miR-148a 的潜在结合位点; miR-148a 真核表达载体构建成功, 转染胃癌细胞后可显著过表达; miR-148a 通过人 CCKBR 3' UTR 上 423bp 处的结合位点抑制 CCKBR 的基因表达; miR-148a 过表达显著抑制胃癌细胞中 CCKBR 的蛋白表达。**结论** CCKBR 是胃癌相关 miR-148a 的靶基因, miR-148a 通过其 3' UTR 上的结合位点抑制 CCKBR 的基因表达和蛋白合成, 提示 miR-148a 可能通过调控 CCKBR 参与胃癌的发生发展。

【关键词】 胃泌素受体; 胆囊收缩素 B 受体; miR-148a; 胃癌; microRNA

【中图分类号】 R735.2 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 09-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.009.001

Gastric cancer related miR-148a targets gastrin receptor CCKBR

GUO Shui-long^{1,2}, ZHU Sheng-tao^{1,2}, LI Peng^{1,2,3}, WANG Yong-jun^{1,2,3}, WANG Min^{1,2},
XING Jie^{1,2}, GUO Qing-dong^{1,2}, SUN Xiu-mei^{1,2}, ZHANG Shu-tian^{1,2,3}

(1. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China;
2. Beijing Key Laboratory for Precancerous Lesion of Digestive Disease, Beijing 100050, China;
3. Beijing Digestive Disease Center, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To investigate the regulation role of gastric cancer related miR-148a on gastrin receptor CCKBR expression, and find the correct binding sites of miR-148a in CCKBR 3' UTR. **Methods** The potential binding sites of miR-148a in the CCKBR 3' UTR were predicted with the bioinformatic tools; The miR-148a expressing plasmid was constructed by PCR, and miR-148a expression was verified by Northern Blot; The luciferase report plasmids containing the wild type and mutated binding sites of CCKBR 3' UTR were constructed, and were used to study the regulation mechanism and identify the binding sites of miR-148a by luciferase activity analysis; The regulation effect of miR-148a on CCKBR protein expression was checked by Western Blot. **Results** Three potential binding sites of miR-148a in the CCKBR 3' UTR were found; The miR-148a expressing plasmid was constructed successfully, and highly expressed miR-148a after transfected to gastric cancer cells; The inhibitory effect of miR-148a on CCKBR protein expression was checked by Western

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(2012CB526600); 北京市科委课题(Z121100007512011)。

[通讯作者] 张澍田, E-mail: slong.guo@gmail.com。

Blot. Over-expression of miR-148a inhibited CCKBR expression by directly binding to the binding site in CCKBR 3' UTR 423bp. **Conclusion** CCKBR is a target of miR-148a, and its expression is inhibited by the binding of miR-148a on its 3' UTR, indicating that miR-148a may participate in the progression of gastric cancer by regulating CCKBR expression.

【Key words】 Gastrin receptor; Cholecystokinin B receptor; miR-148a; Gastric cancer; microRNA

胃癌是严重危害人类健康的常见恶性肿瘤,名列全球第二大癌症死亡原因^[1]。我国是胃癌高发国,每年新发胃癌患者 40 万人,发病率在所有恶性肿瘤居首位,死亡人数达 30 万人,约占所有恶性肿瘤死亡人数的 25% ~ 30%^[2]。胃泌素受体(也称胆囊收缩素 B 受体, CCKBR)是生长因子胃泌素(Gastrin)的重要受体,主要分布于在胃体黏膜的壁细胞和 ECL 细胞。生理上, CCKBR 主要通过与 Gastrin 结合,调节胃液、胃蛋白酶和胆汁的分泌^[3]。近年来的研究发现, Gastrin 及其受体 CCKBR 与胃肠道肿瘤尤其是胃癌的发生密切相关,可作为胃癌早期诊断的重要指标,并可能发展成为胃癌治疗的靶位点^[4-5]。miR-148a 是最早发现,同时也是最重要的胃癌相关 microRNA 之一,但目前对其在胃癌中的作用机制还不十分明确^[6]。本研究从多个方面证实 miR-148a 可以靶向 CCKBR,揭示了二者参与胃癌发生发展的新的功能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

真核表达载体 pIRES2-EGFP 购自 BD 公司, miR-148a Luciferase 报告载体 pGL3-CM 由 pGL3-control 改构。BGC-823 和 293T 细胞由本实验室保存。CCKBR 抗体购自 Abcam 公司,

GAPDH 抗体和二抗购自中杉金桥公司。各种限制性内切酶和 T4 多聚核苷酸激酶购自 NEB 公司。引物和探针合成自 Invitrogen 公司。质粒抽提及凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司,转染试剂购自 Invitrogen 公司,双荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司,其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 miR-148a 靶向 CCKBR 的生物信息学预测:使用 microRNA 在线靶点分析工具 TargetScan (www.targetscan.org) 分析人 CCKBR 基因 3' UTR,发现 3 处 miR-148a 的潜在结合位点,分别位于第 334、423 和 476 碱基处(图 1)。可以看出,miR-148a 与 CCKBR 之间存在很好的靶向关系。

1.2.2 miR-148a 真核表达载体的构建:合成 miR-148a 上下游引物,序列分别为 5'-aaaagatctgaacacac

ctgcaggaagaa-3'和 5'-aaaaaagcttctggcgtctggagcactg-3', PCR 扩增出 164 bp 的产物序列。PCR 产物经切胶回收和连接,插入 pIRES2-EGFP 真核表达质粒。挑阳性克隆进行测序鉴定。

1.2.3 miR-148a 过表达的 Northern Blot 检测:miR-148a 转染细胞后 24 h 提取细胞 RNA,根据文献描述方法进行 Northern Blot 检测,上样量为 20 μ g^[7]。miR-148a 探针序列为其完全互补序列,使用 T4 多聚核苷酸激酶将³²P 标记 5'末端。

1.2.4 荧光素酶活性检测 miR-148a 对 CCKBR 3' UTR 的靶向作用:使用上下游引物 5'-ccgctcaggagggtgaggcaggcacaatgac-3'和 5'-ccgacgcgttggttaaggaaggagggc-3'扩增人 CCKBR 的 3' UTR,并克隆到 pGL3-CM 质粒构建荧光素酶报告载体(野生型)。采用引物 5'-ccggaattcattgttttaga gactatggagc-3'和 5'-ccggaattccattaatctatgtgtgtgag agg-3'; 5'-ccggaattcaaaa taccatcaggcctaac-3'和 5'-ccggaatt ctgattgggaagggtcactgt -3'; 5'-ccggaattcaaaaggtttctcatcct ttcc-3'和 5'-ccggaattcagaacagcctgttggtcaga-3'分别将 CCKBR 3' UTR 的 334、423 和 476 三处 miR-148a 潜在结合位点进行突变,构建荧光素酶报告载体(突变型)。将报告载体与 miR-148a 过表达载体共转染细胞,48 h 后裂解细胞,根据试剂说明书进行检测。检测仪器为 LB 960 Centro XS3 luminometer。

1.2.5 Western Blot 蛋白检测:使用 RIPA 裂解细胞提取蛋白并检测蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳,上样量为 25 ~ 50 μ g。半干法转膜,5%脱脂牛奶封闭,一抗(1:1000)4℃孵育过夜,HRP 偶联二抗室温孵育 1 h,ECL 发光显影。

1.2.6 统计学分析 采用 SPSS 10 进行统计分析,数值采用均数 $\pm$ 标准差表示,组间数据比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-148a 真核表达载体的构建

将构建的 miR-148a 表达载体(IE-148a)进行测序,结果显示 164 bp 的扩增产物(miR-148a 前体)正确插入载体中,序列与 pubmed 数据库完全一致。Northern Blot 检测 miR-148a 载体在 BGC-823 细胞中

Position 334-340 of CCKBR 3' UTR	5' ... ACACAUAAGAUUAUUGGCACUGAU ...
hsa-miR-148a	3' UGUUUAAGACAUCACGUGACU
Position 423-429 of CCKBR 3' UTR	5' ... GACCCUUCUCCAAUCAGCACUGAA ...
hsa-miR-148a	3' UGUUUAAGACAUCA-CGUGACU
Position 476-482 of CCKBR 3' UTR	5' ... ACCAACAGGCUGUUCUGCACUGA ...
hsa-miR-148a	3' UGUUUAAGACAUCACGUGACU

图 1 人 CCKBR 3' UTR 上 miR-148a 结合位点预测

Fig. 1 The prediction of miR-148a binding sites in the 3' UTR of human CCKBR

的表达(图 2),与空载体 Vector 相比,过表达组 miR-148a 的表达量明显增加,证实构建的载体能够在真核细胞中过表达 miR-148a,适合下一步实验使用。

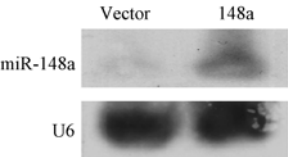


图 2 Northern Blot 检测 miR-148a 真核载体表达

Fig. 2 The miR-148a expressing vector was verified by Northern Blot

2.2 miR-148a 通过与 3' UTR 423 bp 处的靶位点结合,抑制人 CCKBR 基因的表达

荧光素酶活性检测结果显示(图 3),miR-148a 过表达可以明显抑制含 CCKBR 3' UTR 报告载体的荧光素酶活性,大约为空载体对照组的 64% ($P < 0.05$),表明 miR-148a 通过结合 3' UTR 区可抑制 CCKBR 基因的表达。当分别将三个预测的 miR-148a 结合位点突变后,3' UTR 423 bp 处的突变可显著消除 miR-148a 过表达导致的荧光素酶活性降低 ($P > 0.05$)。而 3' UTR 334 bp 和 476 bp 处的结合位点突变没有此效应 ($P < 0.05$),与野生型报告载体的荧光素酶活性相同。结果表明,miR-148a 通过与 CCKBR 3' UTR 334 bp 处结合,直接抑制该基因的表达。

2.3 miR-148a 抑制 CCKBR 蛋白表达

Western Blot 结果显示,如图 4,与空白对照和空载体 Vector 相比,miR-148a 过表达可显著抑制胃癌细胞 BGC-823 中 CCKBR 的蛋白表达。

3 讨论

胃泌素主要由分布于胃窦和十二指肠近端的 G 细胞分泌,通过与受体结合调节胃酸和组胺的分泌

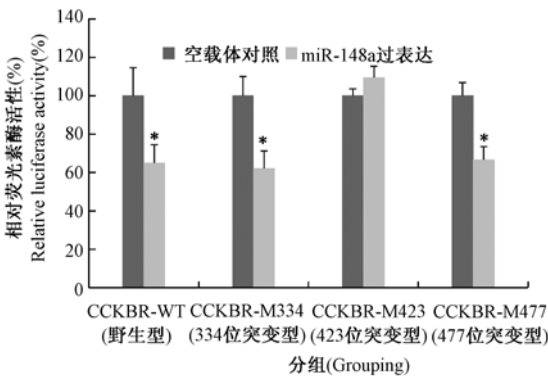


图 3 荧光素酶活性分析检测各组报告载体表达 (* $P < 0.05$)

Fig. 3 The expression of luciferase report vectors was checked by luciferase activity analysis (* $P < 0.05$)

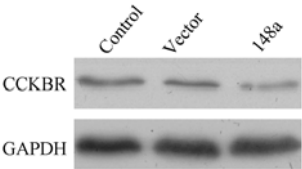


图 4 Western Blot 检测各组细胞 CCKBR 蛋白表达

Fig. 4 The expression of CCKBR protein was checked by Western Blot

来发挥作用。胃泌素在胃中作用的主要靶点是胃体黏膜的壁细胞和肠嗜铬样细胞(ECL)细胞表面分布的受体 CCKBR。小鼠胃 CCKBR 基因敲除导致 ECL 细胞减少,胃壁变薄^[8]。近年来胃泌素及其受体 CCKBR 在消化道肿瘤及其癌前病变中的作用越来越引起人们重视。研究证实,胃癌患者胃癌组织中 CCKBR 的含量明显高于对照正常组织,胃泌素及 CCKBR 广泛参与胃癌发生发展^[4,9-10]。Cui 等^[11]发现高胃泌素血症的日本绵鼠发生胃癌,该胃癌起源于 ECL 细胞,而 CCKBR 拮抗剂 YF476 可阻止高胃泌素引起的胃癌发生^[12]。虽然 CCKBR 在胃

癌发展过程中表达逐渐升高,但其异常表达的机制至今不是十分明确。

microRNA (miRNA) 是一类 22 bp 左右的非编码小 RNA,通过序列互补与特异 mRNA 结合,在转录后水平调控靶基因的表达。我们前期的工作和众多研究组研究结果表明,miR-148a 在人胃癌组织中表达下调,并通过作用于不同的靶分子调控胃癌细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移等^[13-17],是重要的胃癌抑制 miRNAs 之一。我们前期对 miR-148a 在胃黏膜中的表达定位研究结果显示,miR-148a 主要分布于小鼠胃黏膜底部,这一位置主要为壁细胞和 ECL 细胞等分泌细胞,提示 miR-148a 可能参与调控胃黏膜的分泌功能^[14]。此外,我们前期研究还发现,miR-148a 下调是胃癌发生的早期事件,胃癌小鼠模型胃组织中 miR-148a 在小鼠出生 20 d 后即观察到 50% 的下调,60 d 后下调约 80%^[18],这与胃癌发展过程中 CCKBR 的逐渐上升是同步的,提示二者之间可能存在调控关系。本研究中,我们首先通过信息学预测,在 CCKBR 中发现了 3 个 miR-148a 的结合位点。然后,通过构建的 miR-148a 真核表达载体并在胃癌细胞中过表达,我们证明 miR-148a 可直接与 CCKBR 的 3' UTR 结合,抑制其基因表达和蛋白翻译。这一发现,为 CCKBR 表达调控机制和 miR-148a 在胃癌中的作用机制提供了新的解释。

目前,国内外研究者都在开发新的胃癌早期诊断标志物和药物作用靶点,而胃泌素及其受体和 miRNA 是其中的两大热点^[9,19-21]。本研究的结果为胃癌早期筛查和治疗提供了新的潜在靶分子,并为下一步的临床研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents; defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24 (14): 2137-2150.
- [2] Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(1): 17-20.
- [3] Han YM, Park JM, Park SH, *et al*. Gastrin promotes intestinal polyposis through cholecystokinin-B receptor-mediated proliferative signaling and fostering tumor microenvironment [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2013, 64(4): 429-437.
- [4] 黄亚娜,唐世孝. 胃泌素与胃癌关系的研究进展 [J]. *西南军医*, 2012, (05): 757-760.
- [5] 赵蓓,吴岩. 胃泌素与肿瘤发生、发展的关系 [J]. *内蒙古医学院学报*, 2008, (01): 65-68+72.
- [6] Xia J, Guo X, Yan J, *et al*. The role of miR-148a in gastric cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 1649-1656.
- [7] Sun Q, Zhang Y, Yang G, *et al*. Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(8): 2690-2699.
- [8] Nagata A, Ito M, Iwata N, *et al*. G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(21): 11825-11830.
- [9] Dimaline R, Varro A. Novel roles of gastrin [J]. *J Physiol*, 2014, 592(Pt 14): 2951-2958.
- [10] Rai R, Chandra V, Tewari M, *et al*. Cholecystokinin and gastrin receptors targeting in gastrointestinal cancer [J]. *Surg Oncol*, 2012, 21(4): 281-292.
- [11] Cui G, Qvigstad G, Falkmer S, *et al*. Spontaneous ECLomas in cotton rats (*Sigmodon hispidus*): tumours occurring in hypoacidic/hypergastrinaemic animals with normal parietal cells [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(1): 23-27.
- [12] Martinsen TC, Kawase S, Hakanson R, *et al*. Spontaneous ECL cell carcinomas in cotton rats: natural course and prevention by a gastrin receptor antagonist [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(12): 1887-1896.
- [13] Yan J, Guo X, Xia J, *et al*. MiR-148a regulates MEG3 in gastric cancer by targeting DNA methyltransferase 1 [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(3): 879-884.
- [14] Guo SL, Peng Z, Yang X, *et al*. miR-148a promoted cell proliferation by targeting p27 in gastric cancer cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(5): 567-574.
- [15] Zheng B, Liang L, Wang C, *et al*. MicroRNA-148a suppresses tumor cell invasion and metastasis by downregulating ROCK1 in gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(24): 7574-7583.
- [16] Wang SH, Li X, Zhou LS, *et al*. microRNA-148a suppresses human gastric cancer cell metastasis by reversing epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(6): 3705-3712.
- [17] Sakamoto N, Naito Y, Oue N, *et al*. MicroRNA-148a is downregulated in gastric cancer, targets MMP7, and indicates tumor invasiveness and poor prognosis [J]. *Cancer Sci*, 2013, 105(2): 236-243.
- [18] Guo SL, Ye H, Teng Y, *et al*. Akt-p53-miR-365-cyclin D1/cdc25A axis contributes to gastric tumorigenesis induced by PTEN deficiency [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2544-2554.
- [19] 张玲霞,庄坤,张沥,等. 血清胃泌素-17 胃蛋白酶原及幽门螺杆菌 Ig-G 抗体与萎缩性胃炎及胃癌的关系研究 [J]. *检验医学与临床*, 2014(8): 1076-1078.
- [20] 毛秋卉,刘文佳,张学俭,等. 血清胃蛋白酶原和胃泌素-17 在胃癌筛选中的作用 [J]. *国际消化病杂志*, 2012(2): 85-87.
- [21] Tong F, Cao P, Yin Y, *et al*. MicroRNAs in gastric cancer: from benchtop to bedside [J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(1): 24-30.

[修回日期]2014-08-26