

• 论 著 •

miR-432-5p 靶向调控 DDX41 对胃癌细胞增殖、转移和放疗敏感性的影响*

李 伟, 左嘉玮, 马媛媛, 乔 岩, 周立庆[△]

徐州医科大学附属淮安医院/淮安市第二人民医院肿瘤放射治疗科, 江苏淮安 223022

摘要:目的 探讨微小 RNA(miR)-432-5p 对胃癌细胞增殖、转移和放疗敏感性的作用及在此过程中与 DEAD-盒解旋酶 41(DDX41)的靶向调控关系。方法 采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测不同胃癌细胞中 miR-432-5p、DDX41 的表达,将 HGC-27 细胞进行转染并分为 NC 组(未转染质粒)、miR-NC 组(转染 miR-432-5p mimics 阴性对照)、miR-432-5p 组(转染 miR-432-5p mimics)、miR-432-5p+pcDNA-NC 组(转染 miR-432-5p 和 pcDNA-DDX41 阴性对照)、miR-432-5p+pcDNA-DDX41 组(转染 miR-432-5p mimics 和 pcDNA-DDX41)。48 h 后采用 qRT-PCR 检测各组细胞中 miR-432-5p、DDX41 的表达,MTT 检测各组细胞增殖活性,Transwell 实验检测各组细胞的迁移能力,克隆形成实验和流式细胞术检测各组细胞的放疗敏感性,双荧光素酶报告基因实验验证 miR-432-5p 和 DDX41 的靶向关系,建立裸鼠移植瘤模型并检测肿瘤生长情况,蛋白质印迹法检测裸鼠肿瘤组织中 DDX41 蛋白的表达。结果 与正常细胞比较,胃癌细胞中 miR-432-5p 水平降低($P<0.05$),DDX41 mRNA 水平升高($P<0.05$);与 NC 组和 miR-NC 组比较,miR-432-5p 组细胞的存活率、DDX41 mRNA 水平均降低,迁移细胞数减少($P<0.05$),miR-432-5p 水平升高、放疗敏感性增强($P<0.05$);DDX41 过表达逆转了 miR-432-5p 对胃癌细胞增殖、迁移及放疗敏感性的作用($P<0.05$);裸鼠移植瘤实验发现结果显示,与 NC 组和 miR-NC 组比较,miR-432-5p 组小鼠肿瘤组织体积、重量及 DDX41 蛋白表达均降低($P<0.05$)。结论 miR-432-5p 通过靶向下调 DDX41 来抑制胃癌细胞的增殖和转移,增强细胞的放疗敏感性。

关键词:微小 RNA-432-5p; DEAD-盒解旋酶 41; 胃癌; 增殖; 转移; 放疗敏感性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.24.007

中图法分类号:R735.2

文章编号:1673-4130(2023)24-2980-06

文献标志码:A

Effect of miR-432-5p targeting DDX41 on proliferation, metastasis, and radiosensitivity of gastric cancer cells*

LI Wei, ZUO Jiawei, MA Yuanyuan, QIAO Yan, ZHOU Liqing[△]

Department of Cancer Radiotherapy, Affiliated Huai'an Hospital of Xuzhou Medical University/
Huai'an Second People's Hospital, Huai'an, Jiangsu 223022, China

Abstract: Objective To investigate the effects of microRNA (miR)-432-5p on the proliferation, metastasis and radiosensitivity of gastric cancer cells and the targeted regulatory relationship with DEAD-box helicase 41 (DDX41) in this process. **Methods** The expressions of miR-432-5p and DDX41 in different gastric cancer cells were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). HGC-27 cells were transfected and divided into NC group (not transfected with plasmid), miR-NC group (transfected with miR-432-5p mimics negative control), miR-432-5p group (transfected with miR-432-5p mimics), miR-432-5p+pcDNA-NC group (transfection miR-432-5p and pcDNA-DDX41 negative control) and miR-432-5p+pcDNA-DDX41 group (transfection miR-432-5p mimics and pcDNA-DDX41). After 48 h, qRT-PCR was used to detect the expression of miR-432-5p and DDX41 in each group of cells, MTT assay was used to detect the proliferation activity of each group of cells, Transwell assay was used to detect the migration ability of each group of cells, colony formation assay and flow cytometry were used to detect the radiosensitivity of each group of cells. The dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between miR-432-5p and DDX41. The tumor growth of nude mice was detected, and the expression of DDX41 protein in tumor tissues was detected by Western blot. **Results** Compared with normal cells, cancer of the stomach cells miR-432-5p levels were decreased ($P<$

* 基金项目:徐州医科大学 2022 年研究生科研与实践创新计划(SJXC22_1268)。

作者简介:李伟,男,主治医师,主要从事消化道肿瘤治疗相关研究。△ 通信作者,E-mail:hvoxon@163.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20231212.1701.008.html\(2023-12-13\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20231212.1701.008.html(2023-12-13))

0.05), DDX41 mRNA levels were increased ($P < 0.05$). Compared with NC group and miR-NC group, the cell survival rate and DDX41 mRNA level in miR-432-5p group were decreased, the number of migrating cells was decreased ($P < 0.05$), the miR-432-5p level was increased, and the radiosensitivity was enhanced ($P < 0.05$). Overexpression of DDX41 reversed the effects of miR-432-5p on proliferation, migration and radiosensitivity of gastric cancer cells ($P < 0.05$). Compared with NC group and miR-NC group, the volume and weight of tumor tissue and the expression of DDX41 protein in miR-432-5p group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-432-5p through targeted cut DDX41 to inhibit the proliferation and metastasis of gastric cancer cells, enhance cell radiation sensitivity.

Key words: microRNA-432-5p; DEAD-box helicase 41; gastric cancer; proliferation; metastasis; radiosensitivity

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,大多数患者确诊时已处于晚期。尽管关于胃癌治疗策略的研究已经取得很大进展,但胃癌复发和转移使患者死亡率仍然很高,预后不良^[1-2]。胃癌的治疗包括临床手术、放疗、化疗和分子靶向治疗等多种方式,其中放疗在控制局部复发方面起着至关重要的作用^[3-4]。因此,探索胃癌发病的潜在机制对于放疗有效性的提高具有重要意义。目前,一些生物标志物如微小 RNA (miRNA)被广泛用于胃癌诊断或预后,miRNA 是一类小的非编码 RNA,与癌症发展和放疗的改善有关^[5]。有研究表明,miR-144-3p 通过靶向锌指 E 盒结合蛋白 1 增强胃癌细胞放疗敏感性,miR-432-5p 能够抑制卵巢癌、肝细胞癌和鼻咽癌等多种肿瘤的发展,是一种重要的肿瘤抑制分子^[6-7]。研究发现,miR-432-5p 在胃癌细胞中通过被环状 RNA 海绵化来发挥肿瘤抑制功能^[8]。DEAD-盒解旋酶 41 (DDX41)是一种高度保守的蛋白质,其作为干扰素基因 (STING) 刺激物上游的 DNA 传感器,在不同类型的癌症中可能具有双重作用^[9]。本研究以胃癌细胞为研究对象,利用分子生物学技术探讨 miR-432-5p 和 DDX41 在胃癌细胞中的表达差异及二者之间的靶向关系,再进一步研究二者对胃癌细胞增殖、转移和放疗敏感性的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料 人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 购自尚恩生物技术有限公司,人胃癌细胞 MKN-45、HGC-27、NCI-N87 均购自武汉普诺赛生命科技公司。SPF 级 BALB/c 裸鼠,体重(20±2)g,购自厦门大学,许可证号:SCXK(闽)2018-0003,置于温度 20~24 °C,湿度 50%~60%的环境中饲养,光照 12 h 和黑暗 12 h 交替。动物实验通过本院动物伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 CFX Connect 荧光定量 PCR 仪(美国伯乐公司),SpectraMax 多功能酶标仪(美谷分子仪器公司),BD FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。一步法荧光定量试剂盒(南京诺唯赞),Lipofectamine 3000 转染试剂(上海恒斐生物科技有限公司),MTT 细胞增殖检测试剂盒(北京索莱宝科技有

限公司),Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(弗元生物科技有限公司),0.1%结晶紫染色液(北京伊塔生物科技有限公司),Transwell 小室(康宁生命科学有限公司),miR-432-5p mimics 及其阴性对照(miR-NC)、pcDNA-DDX41 及其阴性对照(pcDNA-NC)序列构建(吉满生物科技有限公司),miR-432-5p 和 DDX41 引物设计及合成(广州吉赛生物科技股份有限公司),DDX41、GAPDH 兔多抗、山羊抗兔 IgG(英国 Abcam 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 和人胃癌细胞 MKN-45、HGC-27、NCI-N87 分别接种于含有 10%胎牛血清(FBS)和 1%双抗(青霉素-链霉素)的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 °C,5%CO₂ 的培养箱中培养。待细胞融合率在 80%~90%时进行传代,取第 3 代生长状态较好的细胞进行后续实验。

1.3.2 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测细胞中 miR-432-5p、DDX41 的表达 分别收集人正常胃黏膜上皮细胞和人胃癌细胞,利用 Trizol 法提取总 RNA。然后利用一步法荧光定量试剂盒进行 qRT-PCR 反应,反应体系:2×SYBR Green Mix 10 μL,Enzyme 1 μL,上、下游引物各 0.5 μL,RNA 1 μL,加 ddH₂O 至总体积 20 μL。反应程序:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,共 40 个循环。以 U6、GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 计算细胞中 miR-432-5p 和 DDX41 mRNA 的相对表达水平,引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物

名称	方向	序列(5'-3')
miR-432-5p	F	AACGAGACGACGACAGAC
	R	CTTGGAGTAGGTCATTGGGT
U6	F	AACGAGACGACGACAGAC
	R	GCAAATTCGTGAAGCGTTCCATA
DDX41	F	ATCCACCACCCATCAAGAG
	R	TGTCACGGCCAGATAGAATGG
GAPDH	F	GACTCATGACCACAGTCCATGC
	R	AGAGGCAGGGATGATGTTCTG

1.3.3 细胞转染 取第 3 代且生长状态较好的 HGC-27 细胞,用 Lipofectamine 3000 转染试剂进行转染分组:NC 组(未转染质粒)、miR-NC 组(转染 miR-432-5p mimics 阴性对照)、miR-432-5p 组(转染 miR-432-5p mimics)、miR-432-5p + pcDNA-NC 组(转染 miR-432-5p 和 pcDNA-DDX41 阴性对照)、miR-432-5p + pcDNA-DDX41 组(转染 miR-432-5p mimics 和 pcDNA-DDX41),48 h 后收集细胞,根据 1.3.2 的实验步骤提取细胞 RNA 并检测各组细胞中 miR-432-5p 和 DDX41 mRNA 的表达,确定转染效率。

1.3.4 MTT 检测细胞增殖活性 将 HGC-27 细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种到 96 孔板中,按照转染分组培养 48 h 后,每孔加入 10 μ L MTT(5 mg/mL)溶液再培养 4 h。然后加入 100 μ L 二甲基亚砷混匀,并孵育 10 min,用酶标仪在 490 nm 处测量吸光度,并计算细胞存活率。

1.3.5 Transwell 实验检测细胞的迁移能力 将转染培养 48 h 后的 HGC-27 细胞接种至 Transwell 上室中(2×10^4 个/孔),并在上室加入 200 μ L 的无血清培养基,下室加入 750 μ L 含有 10% FBS 的培养基,在 37 $^{\circ}$ C 下培养 24 h。然后将迁移膜外的细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min,再用 0.1% 结晶紫染色 10 min,最后在显微镜下对迁移的细胞进行计数。

1.3.6 克隆形成实验检测细胞的放疗敏感性 将 HGC-27 细胞转染培养 48 h 后,利用 X 射线装置以 2 Gy/min 的剂量率对各组细胞照射 4 Gy 的放疗剂量,24 h 后收集细胞并接种至 12 孔板中(500 个/孔),培养 10 d 后,弃培养液,将细胞用甲醇固定 30 min,然后用 0.1% 结晶紫染色 15 min,最后在显微镜下分析菌落形成并对形成菌落进行计数。

1.3.7 流式细胞术检测放疗后细胞的凋亡情况 将转染培养后的细胞按照 1.3.6 的方法进行放疗,在 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h。收集各组细胞并用 PBS 清洗,然后将细胞悬浮在 300 μ L 结合缓冲液中,向每个样品中加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI,室温下避光孵育 15 min,用流式细胞仪和 FlowJo 软件分析细胞凋亡情况,计算细胞凋亡率。

1.3.8 双荧光素酶报告基因实验 首先,通过 ENCORI 信息网站预测 miR-432-5p 和 DDX41 在 3' UTR 上的结合位点。然后,将 DDX41 序列片段克隆到 pmir-R-GLO 载体中,构建 DDX41-WT 野生型质粒,并利用突变的 DDX41 片段构建 DDX41-MUT 突变型质粒。随后,利用 Lipofectamine 3000 转染试剂将各质粒与 miR-432-5p mimics 或 miR-NC 共转染至细胞中,24 h 后收集细胞,用双荧光素酶活性检测试剂盒检测细胞荧光素酶活性。

1.3.9 裸鼠移植瘤模型 将裸鼠适应性喂养 1 周

后,将正常培养的 HGC-27 细胞和转染 miR-NC、miR-432-5p mimics 的 HGC-27 细胞以每毫升 1×10^6 个的密度皮下注射到裸鼠腹部右侧(200 μ L),记为 NC 组、miR-NC 组、miR-432-5p 组,每组 6 只。当皮下肿瘤体积大于 200 mm³ 时,每隔 5 天用游标卡尺测量一次肿瘤的长径(a)和短径(b),并利用公式计算肿瘤体积(v): $v(\text{mm}^3) = (ab^2)/2$,持续 25 d 后,处死小鼠并分离肿瘤并称重。

1.3.10 蛋白质印迹法(Western blot)检测肿瘤组织中 DDX41 蛋白的表达 将称重后的组织立即用预冷的 PBS 冲洗,然后置于匀浆器中加入蛋白裂解液进行匀浆,提取总蛋白。然后蛋白进行煮沸变性,并通过 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,然后转移到聚偏二氟乙烯膜中。将聚偏二氟乙烯膜用 5% 脱脂奶粉在室温下封闭 1 h,随后在 4 $^{\circ}$ C 下与 DDX41(1 : 1 000)、GAPDH(1 : 2 500)一抗稀释液一起孵育过夜,然后与山羊抗兔二抗(1 : 500)一起孵育 1 h,最后用 ECL 显影。以 GAPDH 为内参蛋白,通过凝胶成像和 Image J 软件分析蛋白条带。

1.4 统计学处理 采用 Graphpad Prism8.0 软件进行数据统计分析,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两多重比较采用 Tukey's 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同胃癌细胞中 miR-432-5p 和 DDX41 水平比较 与人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 比较,人胃癌细胞 MKN-45、HGC-27、NCI-N87 中 miR-432-5p 水平降低,DDX41 mRNA 水平升高($P < 0.05$),且 HGC-27 细胞中 miR-432-5p 水平最低,DDX41 mRNA 水平最高,见表 2。因此,选择 HGC-27 细胞进行后续实验。

表 2 不同胃癌细胞中 miR-432-5p 和 DDX41 mRNA 水平比较($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	miR-432-5p	DDX41 mRNA
GES-1 组	0.98 \pm 0.06	0.97 \pm 0.06
HGC-27 组	0.23 \pm 0.02 ^a	1.72 \pm 0.14 ^a
MKN-45 组	0.38 \pm 0.02 ^{ab}	1.58 \pm 0.12 ^{ab}
NCI-N87 组	0.47 \pm 0.03 ^{ab}	1.40 \pm 0.11 ^{ab}
F	239.773	25.632
P	< 0.001	< 0.001

注:与 GES-1 组比较,^a $P < 0.05$;与 HGC-27 组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 各组 HGC-27 细胞中 miR-432-5p 和 DDX41 水平比较 与 NC 组和 miR-NC 组比较,miR-432-5p 组细胞中 miR-432-5p 水平升高,DDX41 mRNA 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 miR-432-5p 组和 miR-432-5p + pcDNA-NC 组比较,miR-432-5p +

pcDNA-DDX41 组细胞中 miR-432-5p 水平降低, DDX41 mRNA 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 各组 HGC-27 细胞中 miR-432-5p 和 DDX41 mRNA 水平比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	miR-432-5p	DDX41 mRNA
NC 组	1.02 ± 0.07	0.98 ± 0.06
miR-NC 组	1.00 ± 0.06	0.99 ± 0.06
miR-432-5p 组	2.18 ± 0.16 ^{ab}	0.27 ± 0.02 ^{ab}
miR-432-5p + pcDNA-NC 组	2.16 ± 0.15	0.28 ± 0.02
miR-432-5p + pcDNA-DDX41 组	1.29 ± 0.10 ^{cd}	0.76 ± 0.04 ^{cd}
F	79.842	202.234
P	<0.001	<0.001

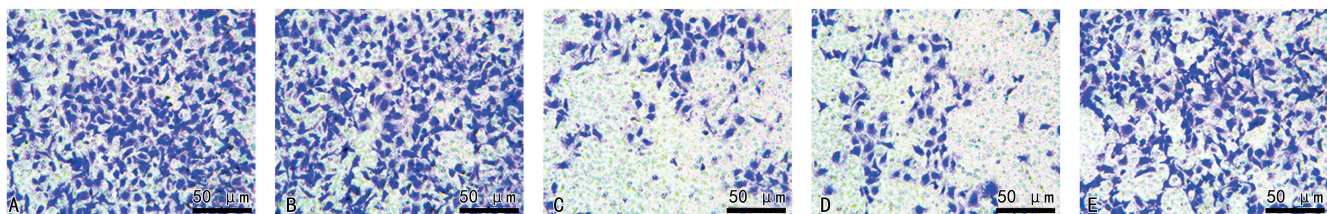
注: 与 NC 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 miR-NC 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 miR-432-5p 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 miR-432-5p + pcDNA-NC 组比较, ^d $P < 0.05$ 。

2.3 miR-432-5p 对 HGC-27 细胞增殖活性的影响 与 NC 组 [(99.63 ± 2.32)%] 和 miR-NC 组 [(98.79 ± 3.83)%] 比较, miR-432-5p 组细胞存活率 [(42.58 ± 4.71)%] 降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 miR-432-5p 组和 miR-432-5p + pcDNA-NC 组 [(43.17 ± 4.63)%] 比较, miR-432-5p + pcDNA-DDX41 组细胞存活率 [(76.92 ± 7.84)%] 升高, 差异

有统计学意义 ($P < 0.05$)。

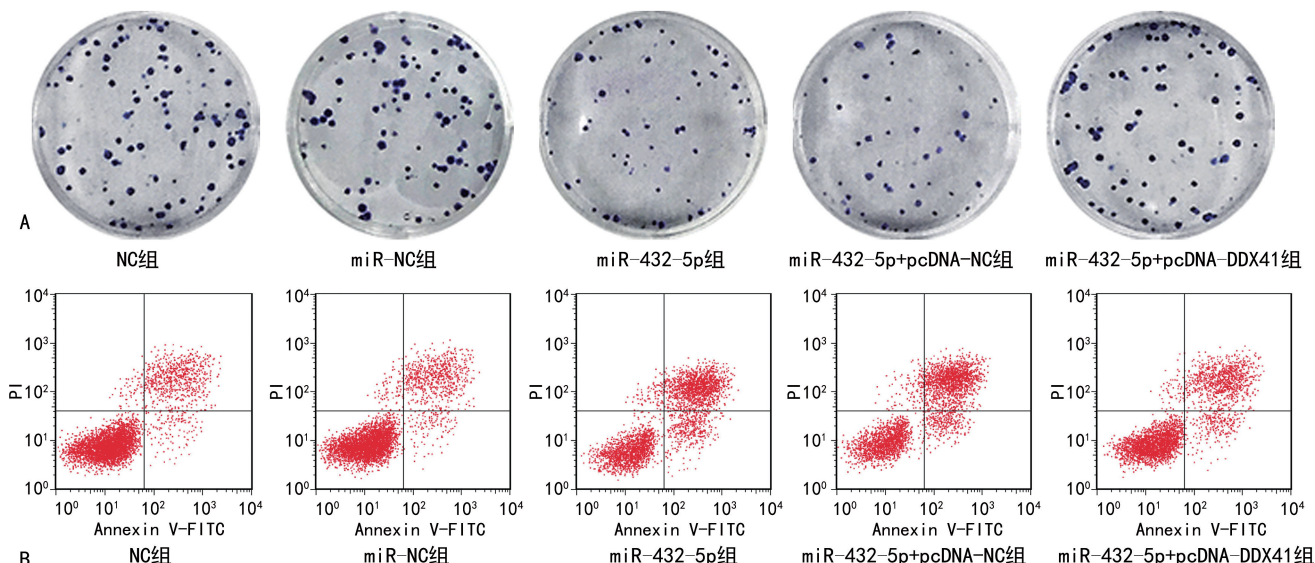
2.4 miR-432-5p 对 HGC-27 细胞迁移能力的影响 与 NC 组 [(216.74 ± 26.34) 个] 和 miR-NC 组 [(208.61 ± 16.42) 个] 比较, miR-432-5p 组细胞迁移数 [(54.86 ± 5.71) 个] 减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 miR-432-5p 组和 miR-432-5p + pcDNA-NC 组 [(53.20 ± 5.64) 个] 比较, miR-432-5p + pcDNA-DDX41 组细胞迁移数 [(162.54 ± 17.83) 个] 增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。

2.5 miR-432-5p 对 HGC-27 细胞放疗敏感性的影响 对各转染组细胞进行放疗后, 与 NC 组、miR-NC 组细胞克隆形成数 [(71.54 ± 7.73) 个、(69.42 ± 6.28) 个] 和凋亡率 [(22.68 ± 3.10)%、(23.93 ± 3.92)%] 比较, miR-432-5p 组细胞克隆形成数 [(23.61 ± 2.87) 个] 减少, 细胞凋亡率 [(68.43 ± 6.12)%] 升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 miR-432-5p 组、miR-432-5p + pcDNA-NC 组细胞克隆形成数 [(23.61 ± 2.87) 个、(22.18 ± 2.92) 个] 和凋亡率 [(68.43 ± 6.12)%、(66.86 ± 6.53)%] 比较, miR-432-5p + pcDNA-DDX41 组细胞克隆形成数 [(54.24 ± 5.56) 个] 增加, 细胞凋亡率 [(37.59 ± 4.24)%] 降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。



注: A~E 分别为 NC 组、miR-NC 组、miR-432-5p 组、miR-432-5p + pcDNA-NC 组、miR-432-5p + pcDNA-DDX41 组 HGC-27 细胞迁移图。

图 1 Transwell 实验检测各组 HGC-27 细胞的迁移能力 (×200)



注: A 为平板克隆检测细胞克隆形成数; B 为流式细胞术检测细胞凋亡率。

图 2 各组 HGC-27 细胞放疗后的克隆形成和凋亡情况

2.6 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-432-5p 与 DDX41 的靶向关系 通过 ENCORI 信息网站预测发现, miR-432-5p 与 DDX41 在 3'-非翻译区(3'-UTR)区域存在靶向结合位点, 见图 3。然后又通过双荧光素酶报告基因实验发现, 与 miR-NC 与 DDX41-WT (野生型)共转染的细胞相对荧光素酶活性 $[(0.99 \pm 0.06)]$ 比较, miR-432-5p mimics 和 DDX41-WT 共转染的细胞相对荧光素酶活性 $[(0.38 \pm 0.02)]$ 降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而与 miR-NC 与 DDX41-MUT 共转染的细胞相对荧光素酶活性 $[(0.98 \pm 0.05)]$ 比较, miR-432-5p mimics 和 DDX41-MUT 共转染的细胞相对荧光素酶活性 $[(1.00 \pm 0.05)]$ 无明显变化($P > 0.05$)。

DDX41 5'-ACAGUCUCCUUCUCUCCAAGA-3'
miR-432-5p 3'-GGUGGGUACUGGAUGAGGUUCU-5'

图 3 miR-432-5p 与 DDX41 的靶向结合位点预测

2.7 miR-432-5p 对裸鼠肿瘤组织的生长及 DDX41 蛋白的影响 移植瘤裸鼠模型建立第 25 d, 与 NC 组和 miR-NC 组肿瘤体积 $[(869.52 \pm 32.14) \text{ mm}^3]$ 、 $843.69 \pm 33.63 \text{ mm}^3]$ 和肿瘤质量 $[(1.93 \pm 0.13) \text{ g}]$ 、 $1.89 \pm 0.15 \text{ g}]$ 比较, miR-432-5p 组裸鼠肿瘤的生长速度缓慢, 肿瘤体积 $[(534.21 \pm 28.34) \text{ mm}^3]$ 和肿瘤质量 $[(0.72 \pm 0.05) \text{ g}]$ 均减小, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 检测肿瘤中 DDX41 蛋白结果显示, 与 NC 组、miR-NC 组 $[(1.02 \pm 0.06)$ 、 $(1.01 \pm 0.05)]$ 比较, miR-432-5p 组肿瘤组织中 DDX41 蛋白表达 $[(0.38 \pm 0.02)]$ 降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见图 4。

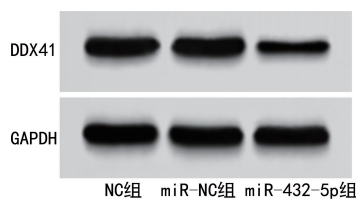


图 4 各组裸鼠肿瘤组织中 DDX41 蛋白表达

3 讨论

胃癌是一种常见的恶性肿瘤, 胃癌晚期患者的主要治疗方法是放疗, 但大多数胃癌晚期患者会发生癌转移、复发及放疗耐受性, 导致存活率依然很低^[10-11]。尽管许多基因已被证明与癌症的放疗敏感性有关, 但胃癌放疗抵抗的机制仍不清楚^[12]。有研究表明, miRNA 已经成为各种癌症发生和发展的关键调节因子, 其参与肿瘤的增殖、分化、DNA 修复和凋亡^[13]。例如 miR-93-5p 的过表达可以通过促进细胞凋亡来增强乳腺癌细胞的放疗敏感性, miR-432-5p 能够促进胃癌细胞的增殖和迁移, 增强宫颈癌的紫杉醇化疗敏

感性^[8,14-15]。但 miR-432-5p 对胃癌细胞放疗敏感性的作用尚不清楚。本研究通过对不同胃癌细胞中 miR-432-5p 水平的检测发现, miR-432-5p 在胃癌细胞中的水平低于正常细胞, 且在 HGC-27 细胞中的水平最低。因此, 将该细胞用于后续实验的研究。将过表达 miR-432-5p 质粒转染至 HGC-27 细胞发现, miR-432-5p 组细胞的存活率降低、迁移细胞数减少, 在接受 4 Gy 的放射剂量治疗后细胞的克隆数减少, 凋亡率升高, 揭示了 miR-432-5p 过表达能够抑制胃癌细胞的增殖和迁移, 增强细胞对放疗的敏感性。

miRNA 能够与其靶 mRNA 3'-UTR 区域的序列结合, 导致 mRNA 降解或抑制蛋白质翻译, 进而在细胞增殖、凋亡、迁移和分化等方面发挥重要作用^[16]。为了进一步探索 miR-432-5p 对胃癌的作用, 本研究通过生物信息学预测发现, DDX41 可能是 miR-432-5p 的靶 mRNA。DDX41 是具有遗传易感性的骨髓肿瘤中最常见的突变基因之一, 可受到种系和体细胞突变的影响^[17]。在髓样树突细胞中充当细胞内 DNA 传感器, 通过 STING 途径激活先天免疫^[18]。据报道, miR-H2-3p 通过靶向 DDX41 来抑制 I 型干扰素的产生并增强单纯疱疹病毒 I 型的免疫逃避, DDX41 的功能丧失会导致核糖体前体生物发生缺陷, 破坏核糖体合成, 从而导致细胞周期停滞和凋亡^[19-20]。虽然 DDX41 参与 RNA 代谢相关的多种重要过程, 并且可能与人类疾病密切相关, 但其在实体恶性肿瘤中的作用研究甚少。因此, 本研究检测了 DDX41 在胃癌细胞中的表达, 结果显示胃癌细胞中 DDX41 mRNA 水平均高于正常细胞, 表明 DDX41 可能参与胃癌的发展过程。而 miR-432-5p 过表达的细胞中 DDX41 mRNA 水平降低, 表明 miR-432-5p 抑制 DDX41 的表达。为了进一步验证 miR-432-5p 与 DDX41 之间的调控关系, 利用 DDX41 进行回补实验发现, DDX41 过表达逆转了 miR-432-5p 对胃癌细胞增殖、迁移及放疗敏感性的作用, 提示了 miR-432-5p 可能通过抑制 DDX41 表达来抑制胃癌细胞的增殖和迁移, 增强细胞放疗敏感性。随后利用生物信息学网站和双荧光素酶报告基因实验验证了 miR-432-5p 与 DDX41 存在靶向调控关系。本研究通过体内移植瘤实验发现, 在 miR-432-5p 过表达的裸鼠中, 肿瘤组织的重量和体积均减小, DDX41 蛋白表达降低, 揭示了 miR-432-5p 过表达可以靶向下调 DDX41, 进而抑制胃癌的恶性发展。

综上所述, miR-432-5p 靶向下调 DDX41 来抑制胃癌细胞的增殖和迁移, 增强细胞放疗敏感性。本研究根据体内外实验为胃癌的治疗提供了新的靶点和理论依据。但临床对 DDX41 在实体瘤发展中的作用

及其机制知之甚少,其在肿瘤中的具体机制还有待进一步深入探索。

参考文献

- [1] ZHANG T, LI X, HE Y, et al. Cancer-associated fibroblasts-derived HAPLN1 promotes tumour invasion through extracellular matrix remodeling in gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2022, 25(2): 346-359.
- [2] SHI L, WANG Z, GENG X, et al. Exosomal miRNA-34 from cancer-associated fibroblasts inhibits growth and invasion of gastric cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(9): 8549-8564.
- [3] WANG L, WANG Z, WANG L. Long noncoding RNA solute carrier family 25 member 21 antisense RNA 1 inhibits cell malignant behaviors and enhances radiosensitivity of gastric cancer cells by upregulating synuclein gamma expression [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2022, 257(3): 225-239.
- [4] HUANG T, LUO X, WU B, et al. Pyrotinib enhances the radiosensitivity of HER2 overexpressing gastric and breast cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(6): 2634-2644.
- [5] LIU J, YAN S, HU J, et al. MiRNA-4537 functions as a tumor suppressor in gastric cancer and increases the radiosensitivity of gastric cancer cells [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 8457-8467.
- [6] GAO Z Y, LIU H, ZHANG Z. miR-144-3p increases radiosensitivity of gastric cancer cells by targeting inhibition of ZEB1 [J]. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23(3): 491-500.
- [7] LUO M, HU Z, KONG Y, et al. MicroRNA-432-5p inhibits cell migration and invasion by targeting CXCL5 in colorectal cancer [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(4): 301.
- [8] LI H, ZHOU X, YU Z, et al. Circ_0075825 promotes gastric cancer progression via adsorbing miR-432-5p to modulate SOX9 [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2022, 77: 100018.
- [9] QIN K, JIAN D, XUE Y, et al. DDX41 regulates the expression and alternative splicing of genes involved in tumorigenesis and immune response [J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(3): 1213-1225.
- [10] WANG X K, ZHANG Y W, WANG C M, et al. MET-TL16 promotes cell proliferation by up-regulating cyclin D1 expression in gastric cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(14): 6602-6617.
- [11] YANG T, HUANG T, ZHANG D, et al. TGF- β receptor inhibitor LY2109761 enhances the radiosensitivity of gastric cancer by inactivating the TGF- β /SMAD4 signaling pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(20): 8892-8910.
- [12] ZHUANG J, HUANG Y, ZHENG W, et al. TMEM100 expression suppresses metastasis and enhances sensitivity to chemotherapy in gastric cancer [J]. *Biol Chem*, 2020, 401(2): 285-296.
- [13] CHUANG P C, CHEN P T, WANG C C, et al. MicroRNA-29a manifests multifaceted features to intensify radiosensitivity, escalate apoptosis, and revoke cell migration for palliating radioresistance-enhanced cervical cancer progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5524.
- [14] PAN C, SUN G, SHA M, et al. Investigation of miR-93-5p and its effect on the radiosensitivity of breast cancer [J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(12): 1173-1180.
- [15] ZHAO Y, LAN Y, CHI Y, et al. Downregulation of Circ-CEP128 enhances the paclitaxel sensitivity of cervical cancer through regulating miR-432-5p/MCL1 [J]. *Biochem Genet*, 2022, 60(6): 2346-2363.
- [16] LIU H, XIANG Y, ZONG Q B, et al. miR-6745-TIMP1 axis inhibits cell growth and metastasis in gastric cancer [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(21): 24402-24416.
- [17] KIM K, ONG F, SASAKI K. Current understanding of DDX41 mutations in myeloid neoplasms [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(2): 344.
- [18] SINGH R S, VIDHYASAGAR V, YANG S, et al. DDX41 is required for cGAS-STING activation against DNA virus infection [J]. *Cell Rep*, 2022, 39(8): 110856.
- [19] DUAN Y, ZENG J, FAN S, et al. Herpes simplex virus type 1-encoded miR-H2-3p manipulates cytosolic DNA-stimulated antiviral innate immune response by targeting DDX41 [J]. *Viruses*, 2019, 11(8): 756.
- [20] SHINRIKI S, MATSUI H. Unique role of DDX41, a DEAD-box type RNA helicase, in hematopoiesis and leukemogenesis [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 992340.

(收稿日期:2023-05-05 修回日期:2023-10-12)