

• 临床研究 •

胃癌中 tsRNA-Glu-5-0048 的表达
及对胃癌细胞生物学行为的影响

周立群, 李哲, 翁秋燕

【摘要】目的 分析 tRNA 衍生小 RNA(tsRNA)-Glu-5-0048 在胃癌组织中的表达水平及其对胃癌细胞恶性生物学行为的影响。**方法** 采用 qPCR 方法检测胃癌-癌旁组织和胃癌细胞系中 tsRNA-Glu-5-0048 的表达水平, 分析 tsRNA-Glu-5-0048 表达水平与胃癌患者临床病理特征之间的关系。设计和合成 tsRNA-Glu-5-0048 的类似物和抑制剂, 利用 CCK-8、Transwell 实验分析上、下调 tsRNA-Glu-5-0048 对正常胃黏膜细胞和胃癌细胞增殖能力、迁移和侵袭能力的影响。**结果** 与癌旁组织比较, 胃癌组织中 tsRNA-Glu-5-0048 的表达水平显著上调($P < 0.05$); 与人正常胃黏膜细胞比较, 胃癌细胞系中 tsRNA-Glu-5-0048 的表达水平显著升高($P < 0.05$); tsRNA-Glu-5-0048 与胃癌分化程度、癌胚抗原及糖抗原 199 有相关性(均 $P < 0.05$)。在胃癌细胞中上调 tsRNA-Glu-5-0048 的表达后, 其细胞增殖、迁移和侵袭能力也显著增强, 下调则相反(均 $P < 0.05$); 上、下调 tsRNA-Glu-5-0048 的表达对正常胃黏膜细胞无影响($P < 0.05$)。**结论** tsRNA-Glu-5-0048 在胃癌中发挥促癌基因的作用, 上调 tsRNA-Glu-5-0048 的表达可促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

【关键词】 tRNA 衍生小 RNA; 胃癌; 生物学行为

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.07.008

【中图分类号】 R735.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)07-0871-05

胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一, 也是全世界第三位肿瘤相关死亡的常见病因^[1-3]。尽管近年来胃癌的诊疗取得了很大的进步, 以手术治疗、化疗、放疗和免疫治疗为主的综合治疗显著改善了胃癌患者的生活质量和生存期限^[4-5]。但由于胃癌早期往往没有典型症状, 导致部分患者被诊断时已丧失手术机会, 晚期胃癌患者的生活质量和预后仍不能令人满意^[6]。因此, 迫切需要探究胃癌发生和发展的分子机制, 以获得更有效的治疗策略。tRNA 衍生小 RNA(tsRNA)曾被认为是随机的 tRNA 降解产物, 随着高通量测序技术的广泛应用, 越来越多的 tsRNA 在细菌、真菌、植物和哺乳动物中被发现^[7]。tsRNA 通过多种作用机制发挥重要生物学功能, 包括抑制翻译、调控基因表达、控制细胞周期及染色质、调节表观遗传修饰和参与免疫反应等^[8]。国内外研究人员通过高通量测序及基因芯片技术, 揭示了 tsRNA 在许多其他癌症中(包括肺癌、乳腺癌、膀胱癌、结直肠癌、B 细胞淋巴瘤、卵巢癌和肝细胞癌等)存在着差

异表达^[9-13]。大量研究证实, tsRNA 参与了癌细胞的增殖、迁移和转移等各个环节调节, 显示出巨大的临床潜力, 如作为诊断、进展和预后的新型生物学标记物, 精确治疗的新靶点等^[10, 14]。本文探讨 tsRNA-Glu-5-0048 在胃癌中的表达及其临床意义, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本收集 收集 2019 年 6 月至 2022 年 5 月在宁波大学附属第一医院接受胃癌根治性手术患者的胃癌组织及其癌旁组织标本。本研究经宁波大学附属第一医院伦理委员会批准(伦理批号: KS202112017), 所有研究者均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

纳入标准: (1) 通过临床和病理检查进行评估, 并且在手术前没有放疗或化疗; (2) 术后病理明确诊断为胃癌; (3) 未合并其他原发恶性肿瘤。排除标准: 既往进行过胃癌手术治疗, 合并其他恶性肿瘤的患者。**1.2 细胞系和主要试剂** 正常胃黏膜上皮细胞株 GES-1 及胃癌细胞株 (AGS 和 HGC-27) 购自北纳生物-河南省工业微生物菌种工程技术研究中心。DMEM、RMPI-1640 培养基、胰酶和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; Lipofectamine 2000 购自美国 Invi-

基金项目: 宁波市科技计划项目(2021J253)

作者单位: 315010 宁波, 宁波大学附属第一医院

通信作者: 翁秋燕, Email: zhangberry2011@163.com

trogen 公司; Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒购自北京 Tiosbio 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 Toyobo 公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; BeyoClick™ EdU-594 细胞增殖检测试剂盒购自江苏碧云天公司; 引物使用 primer5 软件设计, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 类似物和抑制剂委托上海吉玛制药有限公司设计、合成。

1.3 tsRNA-Glu-5-0048 相对表达水平的检测 使用 Trizol 提取组织和细胞中的总 RNA, 根据反转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行反转录和荧光定量 PCR 反应。tsRNA-Glu-5-0048 引物序列为: F, 5'-TCCCACATGGTCTTGGGGTGT-3', R, 5'-GGTACCTCCTCGGATTCC-3'; 内参 RNU6-2 引物序列为: F, 5'-CGGCAGCACATATACTAAAA-TTGGAA-3', R, 5'-CGAATTTGCGTGTGTCATC-CTTGCG-3'。按照制造商的说明进行荧光定量 PCR 的实验, 所有实验重复 3 次, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对基因表达水平。

1.4 生物信息分析 利用生物信息分析在线网站 Kaplan-Meier Plotter 分析 tsRNA-Glu-5-0048 对胃癌患者预后的影响。

1.5 细胞分组和转染 人胃癌细胞系 AGS 和 HGC-27 在含有 10% 胎牛血清和抗生素的 RMPI-1640 培养基中培养。在细胞处于对数生长期时将其接种在 6 孔板中并分为类似组(mimics 组)、对照-类似物组(NC-mimics 组)、抑制剂组(inhibitor 组)和对照-抑制剂组(NC-inhibitor 组)。其中 NC-mimics 组转染单链分子, NC-inhibitor 组转染双链分子, 4 组转染物由上海吉玛公司设计完成。所有操作严格按照 Lipofectamine 2000 说明书进行, 转染 24 h 后, 提取细胞总 RNA, 按照反转录试剂盒说明书反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达水平。

1.6 细胞增殖能力检测 采用 EdU 细胞增殖实验。清洗转染 24 h 后的细胞, 继续培养 2 h, 加入 4% 多聚甲醛固定 20 min 后加入适量洗涤液洗涤, 加入 Click Additive Solution 反应液, 洗涤液洗涤后加入 bis-Benzimidazole H33342 工作液进行染色, 在荧光显微镜下观察检测 AGS 和 HGC-27 细胞的增殖情况。

1.7 Transwell 迁移、侵袭实验 取处于对数生长期

的转染后的细胞, 使用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 用培养基制备成单细胞悬液, 接种到含 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室的上室(100 μ l), 下室添加 600 μ l 含 10% 胎牛血清的完全培养基, 培养 24 h 后, 使用 4% 多聚甲醛固定 10 min 后使用 0.5% 的结晶紫染色 10 min。显微镜下拍照并统计迁移细胞数量。

1.8 统计方法 采用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 t 检验; 计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 tsRNA-Glu-5-0048 在胃癌组织和细胞中的表达水平 荧光定量 PCR 结果表明, 与癌旁组织比较, tsRNA-Glu-5-0048 在胃癌组织中的表达水平显著上升 ($P < 0.05$); tsRNA-Glu-5-0048 在胃癌细胞系 (AGS 和 HGC-27) 中的表达水平均高于人正常胃黏膜细胞系 (均 $P < 0.05$), 见图 1。

2.2 tsRNA-Glu-5-0048 与胃癌患者临床病理特征的关系 根据胃癌组织中 tsRNA-Glu-5-0048 的表达情况, 分为高表达组 ($n=25$) 和低表达组 ($n=20$)。单因素分析显示, tsRNA-Glu-5-0048 的高表达水平与胃癌分化程度、癌胚抗原 (CEA) 及糖抗原 (CA) 199 有相关性 (均 $P < 0.05$), 见表 1。

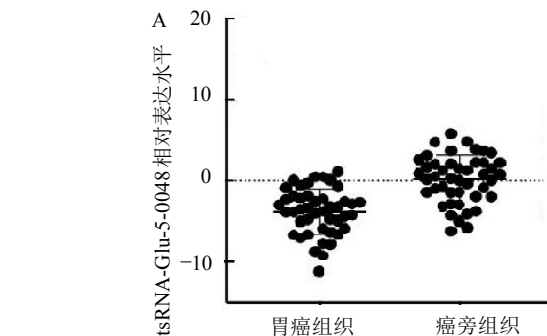
2.3 tsRNA-Glu-5-0048 转染效果验证 转染了 tsRNA-Glu-5-0048 类似物的 AGS 和 HGC-27 细胞中 tsRNA-Glu-5-0048 的表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$); 而转染了抑制剂的 AGS 和 HGC-27 细胞, tsRNA-Glu-5-0048 的表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.4 tsRNA-Glu-5-0048 转染对细胞增殖能力的影响 上调 tsRNA-Glu-5-0048 的表达水平能促进胃癌细胞株 AGS 和 HGC-27 细胞的生长增殖能力 (均 $P < 0.05$); 下调 tsRNA-Glu-5-0048 的表达水平抑制了胃癌细胞 AGS 和 HGC-27 细胞的生长增殖能力 (均 $P < 0.05$), 见图 3。

2.5 tsRNA-Glu-5-0048 转染对细胞迁移能力的影响 与对照组相比, 上调 tsRNA-Glu-5-0048 的表达水平能提高胃癌细胞株 AGS 及 HGC-27 细胞的迁

表 1 tsRNA-Glu-5-0048 与胃癌患者临床病理特征的关系

临床特征	例数	高表达(n=25)	低表达(n=20)	χ^2 值	P 值
性别(例)				0.29	> 0.05
男	20	12	8		
女	25	13	12		
年龄(岁)				0.16	> 0.05
≤60	21	11	10		
> 60	24	14	10		
分化程度(例)				5.95	< 0.05
高分化	30	21	9		
低分化	15	4	11		
肿瘤大小(cm)				0.07	> 0.05
≤5	26	14	12		
> 5	19	11	8		
TNM 分期(例)				1.76	> 0.05
I	13	7	6		
II	9	5	4		
III	10	6	4		
IV	8	7	1		
癌胚抗原(例)				4.86	< 0.05
阳性	24	17	7		
阴性	21	8	13		
糖抗原 199(例)				6.00	< 0.05
阳性	18	6	12		
阴性	27	19	8		



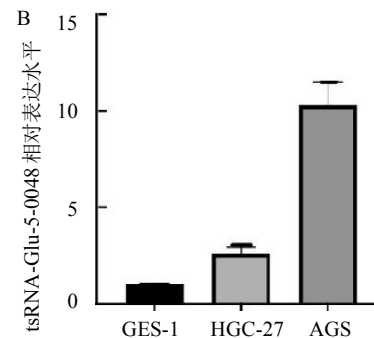
移能力(均 $P < 0.05$); 而下调 tsRNA-Glu-5-0048 的表达水平抑制了胃癌细胞株 AGS 和 HGC-27 细胞的迁移能力(均 $P < 0.05$), 见图 4。

2.6 tsRNA-Glu-5-0048 转染对细胞侵袭能力的影响 与对照组相比, 上调 tsRNA-Glu-5-0048 的表达水平能促进胃癌细胞株 AGS 及 HGC-27 细胞的侵袭能力(均 $P < 0.05$); 而下调 tsRNA-Glu-5-0048 的表达水平抑制了胃癌细胞株 AGS 和 HGC-27 细胞的侵袭能力(均 $P < 0.05$), 见图 5。

3 讨论

随着中国老龄化人口比例的增加, 胃癌造成的社会负担逐渐增大。然而, 由于缺乏对胃癌发生发展的分子机制的清晰理解, 这些患者的临床治疗存在一定的阻碍和受限。因此, 揭示胃癌侵袭转移的分子机制, 寻找无创、简单、可行的新型生物标志物, 对预防和控制胃癌这一恶性肿瘤具有重要意义^[15]。

tsRNA 是一种新型的非编码短 RNA, 越来越受



注: A 为 tsRNA-Glu-5-0048 在胃癌组织和癌旁组织中的表达情况; B 为 tsRNA-Glu-5-0048 在人正常胃黏膜细胞系 GES-1、人胃癌细胞系 AGS、HGC-27 中的表达水平

图 1 tsRNA-Glu-5-0048 的表达水平

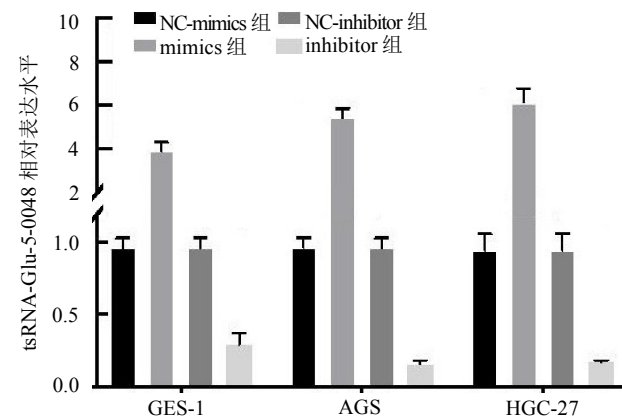


图 2 类似物和抑制剂转染后正常胃黏膜细胞 GES-1 和胃癌细胞 AGS、HGC-27 中 tsRNA-Glu-5-0048 的表达

到学者的关注。目前, 已知转录因子(tRF)参与各种生理和病理过程, 例如传染病和肿瘤形成, 以及神经退行性疾病。tiRNA-Gly 是一种 5'-tRNA 半体, 通过与 RBM17 结合并诱导选择性剪接促进甲状腺乳头状癌细胞的迁移和增殖^[16]。tRF Lys-CTT-010 通过调节糖代谢促进三阴性乳腺癌的恶性进展^[17]。这些研究表明, 异常表达的 tRF 与肿瘤生物学功能的改变有关, tRF 有望作为肿瘤诊断或预后标志物甚至肿瘤治疗靶点。

目前有文献报道, 发现胃癌中 tsRNA 的异常表达。本课题组前期研究发现上调 tRF-19-3L7L73JD

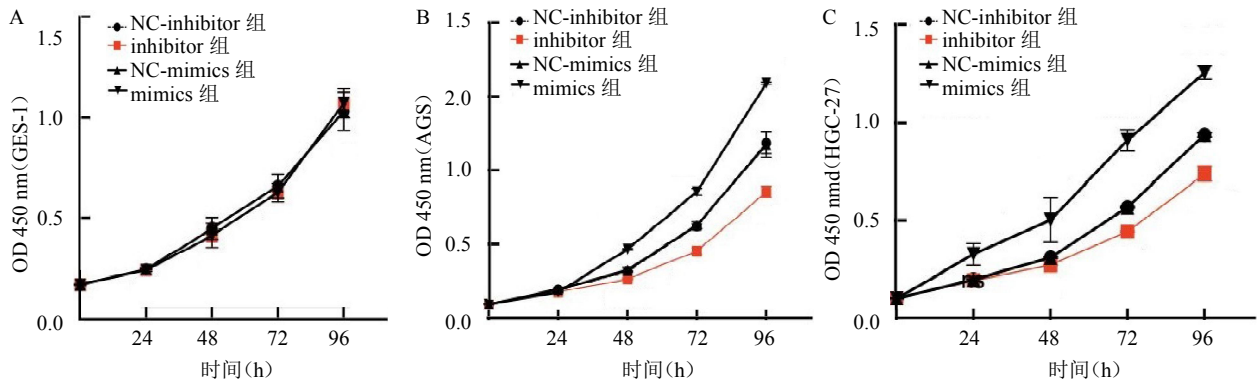


图3 tsRNA-Glu-5-0048 转染对细胞增殖能力的影响

和 tRF-33-P4R8YP9LON4VDP 表达后抑制胃癌细胞的增殖和迁移, 促进细胞凋亡^[18-19]。Dong 等^[20]证实 tRF-24-V29K9UV3IU 可能通过抑制细胞增殖、迁移、侵袭, 同时通过调节 Wnt 信号通路促进细胞凋亡来阻碍胃癌的进展。Zhang 等^[21]鉴定了胃癌相关的 tRF-3019a, 其来源于 tRNA-Ala-AGC-1-1, 他们发现 tRF-3019a 在胃癌组织和胃癌细胞株中被上调。细胞表型研究显示, tRF-3019a 上调以后可促进胃癌细胞

的增殖、迁移及侵袭; 而敲低 tRF-3019a 则会抑制胃癌细胞的恶性进程。Cui 等^[22]发现一种新的 tRF-Val 在胃癌细胞株及组织中显著上调, 其 tRF-Val 的表达水平与胃癌组织的肿瘤大小及浸润深度呈正相关; 同时 tRF-Val 能促进胃癌的增殖和侵袭, 并抑制胃癌细胞的凋亡。Zheng 等^[23]研究者发现 tiRNA-Val-CAC-001 在胃癌组织及胃癌细胞株中被下调, tiRNA-Val-CAC-001 主要定位于细胞质中, 其过表达能够抑制胃癌细胞的增殖及迁移, 促进胃癌细胞凋亡; 然而, 敲低 tiRNA-Val-CAC-001 后则增加胃癌细胞的增殖及迁移, 并减少胃癌细胞凋亡。然而, 目前关于 tRF 在胃癌中作用的研究数量和深度都相当有限, tRF 调控胃癌生物学功能的机制尚不清楚, 需要进一步研究。

本研究中在组织水平验证 tsRNA-Glu-5-0048 的表达, 结果表明 tsRNA-Glu-5-0048 在胃癌组织中显著高表达; 在细胞水平进一步探讨 tsRNA-Glu-5-0048

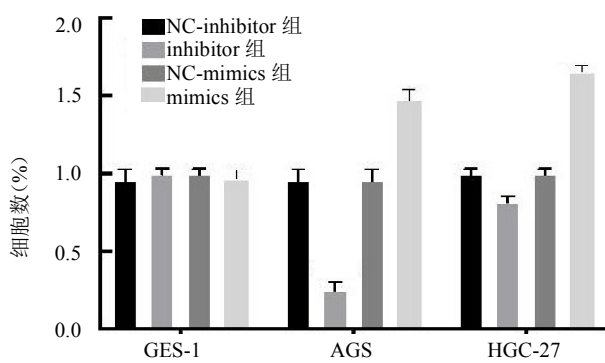


图4 tsRNA-Glu-5-0048 转染对细胞迁移能力的影响

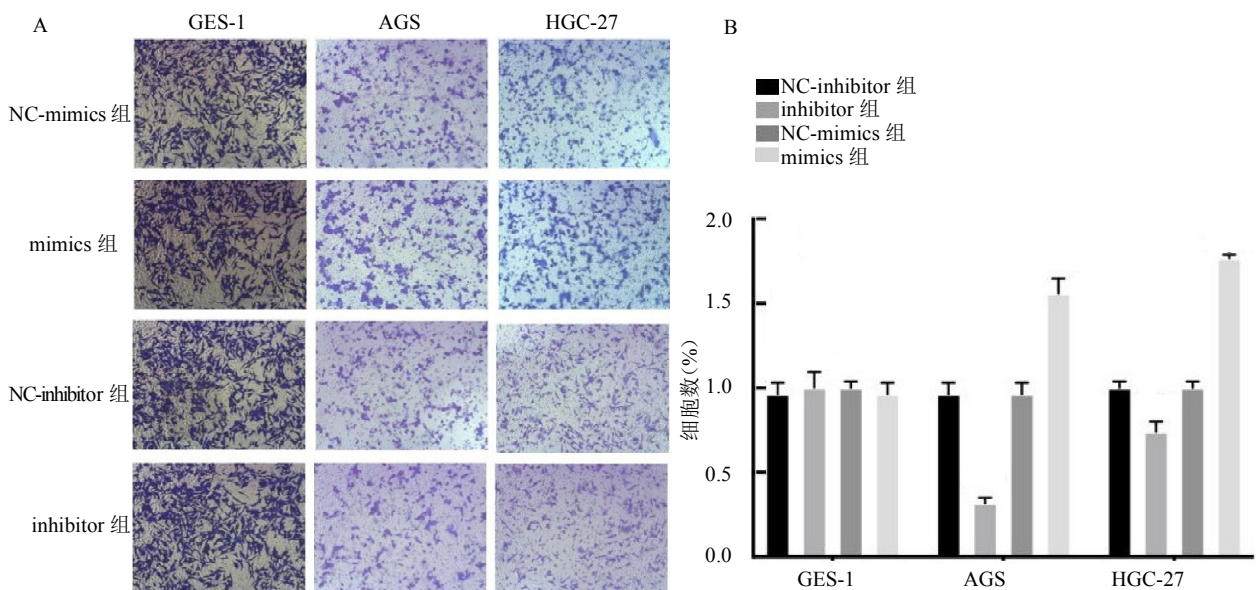


图5 tsRNA-Glu-5-0048 转染对细胞侵袭能力的影响

对胃癌细胞生长的影响作用,结果显示上调 tsRNA-Glu-5-0048 后,可以促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭;下调 tsRNA-Glu-5-0048 的表达后,则抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭,对于正常胃黏膜细胞则无影响。这些结果表明 tsRNA-Glu-5-0048 是作为一种促癌性 RNA 在体内发挥促进胃癌的作用的。

综上所述,本研究从组织水平、细胞水平,探究了 tsRNA-Glu-5-0048 的表达差异及生物学作用。发现 tsRNA-Glu-5-0048 在胃癌细胞、组织中均为显著高表达,tsRNA-Glu-5-0048 可以促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭,可能促进胃癌的进展。但 tsRNA-Glu-5-0048 如何抑制胃癌的发生发展,仍需要进一步探索潜在的分子机制。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 周立群:实验操作、论文撰写;李哲:数据整理、统计学分析;翁秋燕:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] THRIFT A P, EL-SERAG H B. Burden of gastric cancer[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18(3): 534-542.
- [2] SMYTH E, NILSSON M, GRABSCH H, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-648.
- [3] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [4] SHAH S C, PIAZUELO M B, KUIPERS E J, et al. AGA clinical practice update on the diagnosis and management of atrophic gastritis: Expert review[J]. Gastroenterology, 2021, 161(4): 1325-1332.e7.
- [5] TONG W H, YE F, HE L, et al. Serum biomarker panels for diagnosis of gastric cancer[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 2455-2463.
- [6] AJANI J A, D'AMICO T A, BENTREM D J, et al. Gastric cancer, version 2.2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2022, 20(2): 167-192.
- [7] 黄炯杰,陈乐意,廖奇. tRNA 衍生片段的鉴定及对靶分子的调节机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2022, 38(4): 438-451.
- [8] ZHU L W, GE J X, LI T W, et al. tRNA-derived fragments and tRNA halves: The new players in cancers[J]. Cancer Lett, 2019, 452: 31-37.
- [9] HU F, NIU Y, MAO X, et al. tsRNA-5001a promotes proliferation of lung adenocarcinoma cells and is associated with postoperative recurrence in lung adenocarcinoma patients[J]. Transl Lung Cancer Res, 2021, 10(10): 3957-3972.
- [10] FARINA N H, SCALIA S, ADAMS C E, et al. Identification of tRNA-derived small RNA (tsRNA) responsive to the tumor suppressor, RUNX1, in breast cancer[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(6): 5318-5327.
- [11] WU Y M, YANG X L, JIANG G M, et al. 5'-tRF-GlyGCC: A tRNA-derived small RNA as a novel biomarker for colorectal cancer diagnosis[J]. Genome Med, 2021, 13(1): 20.
- [12] YU X, XIE Y, ZHANG S, et al. tRNA-derived fragments: Mechanisms underlying their regulation of gene expression and potential applications as therapeutic targets in cancers and virus infections[J]. Theranostics, 2021, 11(1): 461-469.
- [13] KATSARAKI K, ADAMOPOULOS P G, PAPAGEORGIOU S G, et al. A 3' tRNA-derived fragment produced by tRNA^{Leu}AAG and tRNA^{Leu}TAG is associated with poor prognosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia, independently of classical prognostic factors[J]. Eur J Haematol, 2021, 106(6): 821-830.
- [14] MA Z, ZHOU J, SHAO Y, et al. Biochemical properties and progress in cancers of tRNA-derived fragments[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(3): 2058-2063.
- [15] WANG Y, LI Z, WENG Q Y, et al. Clinical diagnostic values of transfer RNA-derived fragment tRF-41-YDLBRY73W0K5KKOVD and its effects on the growth of gastric cancer cells[J]. DNA Cell Biol, 2023, 42(3): 176-187.
- [16] HAN L T, LAI H J, YANG Y C, et al. A 5'-tRNA half, tRNA-Gly promotes cell proliferation and migration via binding to RBM17 and inducing alternative splicing in papillary thyroid cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 222.
- [17] ZHU P, LU J J, ZHI X L, et al. tRNA-derived fragment tRFLys-CTT-010 promotes triple-negative breast cancer progression by regulating glucose metabolism via G6PC[J]. Carcinogenesis, 2021, 42(9): 1196-1207.
- [18] SHEN Y, XIE Y, YU X, et al. Clinical diagnostic values of transfer RNA-derived fragment tRF-19-3L7L73JD and its effects on the growth of gastric cancer cells[J]. J Cancer, 2021, 12(11): 3230-3238.
- [19] SHEN Y, YU X, RUAN Y, et al. Global profile of tRNA-derived small RNAs in gastric cancer patient plasma and identification of tRF-33-P4R8YP9LON4VDP as a new tumor suppressor[J]. Int J Med Sci, 2021, 18(7): 1570-1579.
- [20] DONG X L, FAN X R, HE X X, et al. Comprehensively identifying the key tRNA-derived fragments and investigating their function in gastric cancer processes[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 10931-10943.
- [21] ZHANG F, SHI J X, WU Z H, et al. A 3'-tRNA-derived fragment enhances cell proliferation, migration and invasion in gastric cancer by targeting FBXO47[J]. Arch Biochem Biophys, 2020, 690: 108467.
- [22] CUI H P, LI H, WU H, et al. A novel 3'tRNA-derived fragment tRF-Val promotes proliferation and inhibits apoptosis by targeting EEF1A1 in gastric cancer[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(5): 471.
- [23] ZHENG J Y, LI C, ZHU Z N, et al. A 5'-tRNA derived fragment Named tRNA-val-CAC-001 works as a suppressor in gastric cancer[J]. Cancer Manag Res, 2022, 14: 2323-2337.

收稿日期:2024-03-25

(本文编辑:吴迪汉)