

• 论 著 •

miR-193a-3p 在胃癌中调节细胞凋亡的分子机制研究*

潘新平,田 立

(定西市人民医院肿瘤科,甘肃定西 743000)

摘要:目的 探讨微小 RNA 193-a-3p(miR-193a-3p)在胃癌中调节细胞凋亡的分子机制。**方法** 运用实时荧光定量 PCR 在健康人胃黏膜细胞系 GES-1、人胃癌细胞系 MKN-45、SGC-7901、MGC-803、SNU16 检测 miR-193a-3p 的相对表达水平;通过 TargetScan 在线分析和荧光素酶报告系统检测 miR-193a-3p 的靶基因;过表达或敲低 miR-193a-3p 后,免疫印迹试验检测靶基因和细胞凋亡标志蛋白的表达量以及细胞凋亡检测试验(Annexin V 双染色法)检测细胞的凋亡水平。**结果** 相比于健康人胃黏膜细胞系 GES-1,miR-193a-3p 在人胃癌细胞系 MKN-45、SGC-7901、MGC-803、SNU16 中低表达($P < 0.05$),并且 MGC-803 的表达量最低。miR-193a-3p 靶向 P21 活化激酶 4 (PAK4) 的 3 端非编码区。过表达 miR-193a-3p 后,PAK4 的表达量降低,而凋亡标志蛋白 cleaved-caspase3 表达量升高,胃癌细胞 MGC-803 的凋亡水平上升($P < 0.05$)。敲低 miR-193a-3p 后,PAK4 的表达量升高,而凋亡标志蛋白 cleaved-caspase3 表达量降低,胃癌细胞 MGC-803 的凋亡水平下降($P < 0.05$)。**结论** miR-193a-3p 通过靶向调节 PAK4 促进胃癌细胞发生细胞凋亡。

关键词:miR-193a-3p; 胃癌; 细胞凋亡; P21 活化激酶 4**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2020.17.011**中图法分类号:**R735.2**文章编号:**1673-4130(2020)17-2096-04**文献标识码:**A

Molecular mechanism of mir-193a-3p regulating apoptosis in gastric cancer*

PAN Xinping, TIAN Li

(Department of Oncology, Dingxi Municipal People's Hospital, Dingxi, Gansu 743000, China)

Abstract:Objective To investigate the molecular mechanism of microRNA 193-a-3p (miR-193a-3p) in regulating cell apoptosis in gastric cancer. **Methods** Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the relative expression levels of miR-193a-3p in healthy human gastric mucosal cell lines GES-1, human gastric cancer cell lines MKN-45, SGC-7901, MGC-803, and SNU16; the target gene of miR-193a-3p by TargetScan online analysis and luciferase reporter system was detected; after overexpression or knockdown of miR-193a-3p, the expression of target gene was detected by Western blotting. The level of cell apoptosis were detected by Apoptosis detection experiment (Annexin V PI double staining method). **Results** Compared with the healthy human gastric mucosal cell line GES-1, miR-193a-3p was lower expressed in human gastric cancer cell lines MKN-45, SGC-7901, MGC-803, and SNU16 ($P < 0.05$), and MGC-803 had the lowest expression level. miR-193a-3p targets the 3 non-coding region of P21-activated kinase 4 (PAK4). After overexpression of miR-193a-3p, the expression of PAK4 decreased, and the expression of apoptosis marker protein cleaved-caspase3 increased, and the apoptosis level of gastric cancer cell MGC-803 increased ($P < 0.05$). After knocking down miR-193a-3p, the expression of PAK4 increased, while the expression of apoptosis marker protein cleaved-caspase3 decreased, and the apoptosis level of gastric cancer cell MGC-803 decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-193a-3p promotes apoptosis of gastric cancer cells by targeting PAK4.

Key words:miR-193a-3p; 胃癌; 凋亡; P21 活化激酶 4

胃癌作为恶性肿瘤之一,是与癌症相关的第二大常见死亡原因^[1]。遗憾的是,早期胃癌很难诊断,患者通常无特异症状,因此该病的早期诊断存在一定困

难。为了给分子治疗提供基础,有必要对胃癌发生、发展的分子机制进行了解^[2]。微小 RNA(miRNA)是体积较小(<20 bp)的非编码 RNA 家族成员之一,

* 基金项目:甘肃省自然科学基金项目(2019-0405-JCC-0940)。

作者简介:潘新平,男,主治医师,主要从事恶性肿瘤的化疗及免疫治疗的研究。

本文引用格式:潘新平,田立. miR-193a-3p 在胃癌中调节细胞凋亡的分子机制研究[J]. 国际检验医学杂志,2020,41(17):2096-2099.

miRNA 与靶 mRNA 结合, 通过控制翻译、增加靶 mRNA 的降解、促进转录后翻译 3 种途径调控蛋白表达^[3]。每个 miRNA 都有数百个靶区, 可以调节大多数遗传途径, 并可同 30% 的人类基因结合。已有研究表明, 下调 miR-193-3p 可通过调控 PTEN 基因抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和化疗耐药^[4]。然而在胃癌细胞中 miR-193-3p 与细胞凋亡的相关研究尚未明了^[5]。基于此, 本研究旨在探讨 miR-193a-3p 在胃癌中调节细胞凋亡的分子机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 pMir-Glo utr1 质粒购自广州基旦生物科技有限公司(货号:JD190929001M)。RPMI-1640 培养基购自北京市普京康利科技有限公司(货号:PM150110)。胎牛血清(FBS)购自上海中乔新舟生物科技有限公司(货号:0025)。PAK4, GAPDH, cleaved-caspase3 抗体购自 Abcam 公司(货号:ab62509, ab37168, ab2302)。蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自上海皓元生物医药科技有限公司(货号:HY-K0010)。HiGene 转染试剂购自广州市左克生物科学发展有限公司(货号:C1506)。磷酸盐缓冲液(PBS)购自北京华夏远洋科技有限公司(货号:C0221A)。快速定点突变试剂盒购自杭州开泰生物技术有限公司(货号:KM101)。2×预混快速实时荧光定量 PCR 试剂盒购自北京康润诚业生物科技有限公司(货号:A301-01)。青链霉素混合液(100×)购自北京强欣博瑞生物技术有限公司(货号:CC014a)。逆转录试剂盒购自深圳市凯联生物技术有限公司(货号:205313)。2×十二烷基硫酸钠(SDS)蛋白电泳上样缓冲液购自上海甄准生物科技有限公司(货号:ZZR-E270-1ML)。双荧光素酶报告基因试剂盒购自武汉纯度生物科技有限公司(货号:CDLG-4997)。蛋白裂解液购自碧云天生物技术有限公司(货号:P0013)。miR-193a-3p 类似物, miR-193a-3p 抑制剂均由上海生工合成。总 RNA 提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司(货号:R1200-100T)。健康人胃黏膜细胞系 GES-1 购自北京博蕾德国际贸易有限公司(货号:CX0441)。人胃癌细胞系 MKN-45 购自成都乾辰生物医药科技有限公司(货号:CX0439)。人胃癌细胞系 SGC-7901 购自深圳市译码生物科技有限公司(货号:100674)。人胃癌细胞系 MGC-803 购自广州永诺生物科技有限公司(货号:CC0404)。人胃癌细胞系 SNU16 购自上海信裕生物科技有限公司(货号:XY-H0797)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 将正常人胃黏膜细胞系 GES-1 作为对照组, 人胃癌细胞系 MKN-45、SGC-7901、MGC-803、SNU16 在 RPMI-1640 培养基中培养, 加入 10% FBS、100 IU/mL 青霉素和 100 mg/mL

链霉素, 在 37 ℃ 含 5% CO₂ 的湿润环境中培养。将 miR-193a-3pp 类似物或 miR-193a-3p 抑制剂同 HiGene 转染试剂以 1:3 的比例混合, 在室温下静置 20 min 后缓慢滴入人胃癌细胞 MGC-803 的培养基中。

1.2.2 RNA 提取与实时荧光定量 PCR 采用总 RNA 提取试剂盒联合 DNase 处理从健康人胃黏膜细胞系 GES-1、人胃癌细胞系 MKN-45、SGC-7901、MGC-803、SNU16 中提取总 RNA, 并采用逆转录试剂盒进行逆转录。使用快速实时荧光定量 PCR 预混体系试剂盒进行实时荧光定量 PCR。使用内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)序列检测系统进行定量 PCR 分析。使用 GAPDH 比较相对量化的 mRNA 水平, 并采用 2^{-ΔΔct} 法进行相关运算。

1.2.3 免疫印迹试验 细胞在 RIPA 缓冲液(50 mmol/L Tris-base, 1.0 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% 脱氧胆酸钠, 1 mm PMSF)中溶解。裂解液在 4 ℃ 下、以 12 000 × g 离心 10 min。用 Bradford 法测定蛋白浓度。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离等量的蛋白, 然后转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上。将膜清洗、堵塞, 然后在 4 ℃ 下用一抗(caspase3, GAPDH, PAK4)孵育过夜, 然后在室温下用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗孵育 1 h。采用增强化学发光法对蛋白带进行检测。

1.2.4 荧光素酶报告系统 使用 miRDB 在线预测 miR-193a-3p 靶基因。初步鉴定出目标基因 P21 活化激酶 4(PAK4)。从人 cDNA 文库中扩增出 PAK4 3' UTR 的野生型序列。miR-193a-3p 结合位点的突变是通过快速突变试剂盒定点突变引入的。PCR 产物被克隆到 pMir-Glo 载体上, 该载体位于限制位点 XhoI 和 NotI 之间的萤火虫荧光素酶编码区下游。通过双荧光素酶报告基因试剂盒进行荧光素酶活性的检测。

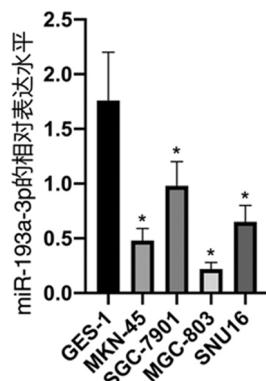
1.2.5 细胞凋亡检测实验(Annexin V-FITC/PI 双染色法) 转染 24 h 后, 利用胰蛋白酶消化收获细胞, 用预冷却的 PBS 洗涤并在 -20 ℃ 下用 70% 乙醇溶液固定过夜。将胃癌细胞 BGC-803 洗涤两次, 在黑暗中 37 ℃ 下重悬于含有 0.1 mg/mL RNase A 和 0.1% Triton X-100 的 PBS 中 30 min。根据制造商的方案, 使用凋亡检测试剂盒, 用膜联蛋白 V(Annexin V)-荧光素异硫氰酸酯(FITC)和碘化丙啶(PI)对总共 1 × 10⁶ 个细胞进行双染色并通过荧光显微镜观察。将实验组中凋亡细胞的百分比与对照转染组进行比较。所有样品均进行 3 次重复试验。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计学软件进行分析。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验; 非正态分布的计量资料采用 $M(P_{25})$,

P_{75}) 表示, 组间比较采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

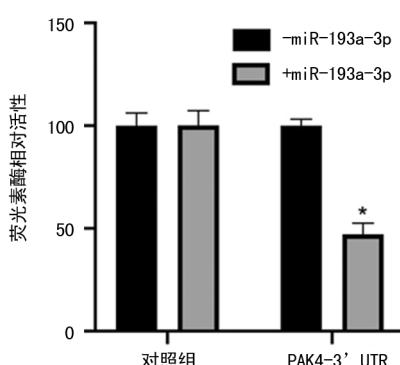
2.1 miR-193a-3p 在胃癌细胞中低表达 健康人胃黏膜细胞系 GES-1、人胃癌细胞系 MKN-45、SGC-7901、MGC-803、SNU16 的 RNA 被提取后, 通过实时荧光定量 PCR 结果发现 miR-193a-3p 在健康人胃黏膜细胞系 GES-1 中高表达 ($P < 0.05$), 而在人胃癌细胞系 MKN-45、SGC-7901、MGC-803、SNU16 中低表达 ($P < 0.05$), 并且 MGC-803 细胞的表达量最低, 见图 1。



注: 与人胃黏膜细胞系 GES-1 中 miR-193a-3p 表达量相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 miR-193a-3p 在不同细胞系的表达情况

2.2 miR-193a-3p 靶向 PAK4 的 3 端非编码区 通过 TargetScan 在线分析, 发现 miR-193a-3p 与 PAK4 的 3 端非编码区存在互补区域。通过荧光素酶报告系统发现 miR-193a-3p 靶向 PAK4 的 3 端非编码区 ($P < 0.05$), 见图 2。

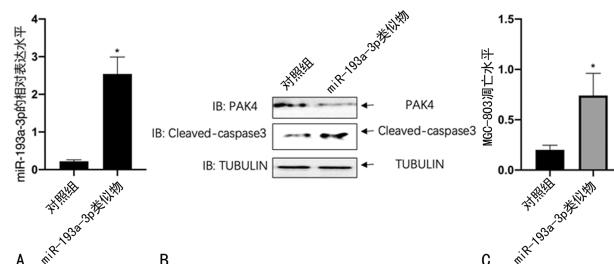


注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 miR-193a-3p 靶向 PAK4 的 3 端非编码区

2.3 过表达 miR-193a-3p 细胞变化情况 转染 miR-193a-3p 类似物后, 胃癌细胞 MGC-803 中的 miR-193a-3p 水平上升, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3A。并且, 免疫蛋白印迹发现 PAK4 的表达量降低, 而凋亡标志蛋白 cleaved-caspase3 表达量升高, 见图 3B。同时, 胃癌细胞 MGC-803 的凋亡水平上升, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3C。

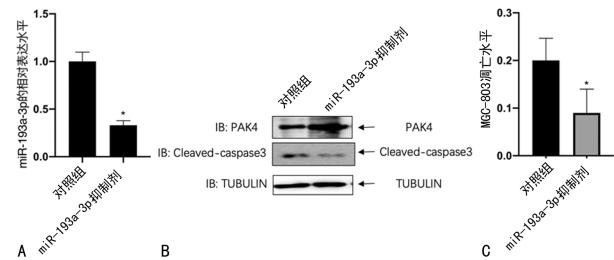
计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3C。



注: 与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 过表达 miR-193a-3p 后, PAK4 的表达水平和细胞凋亡水平

2.4 敲低 miR-193a-3p 后细胞变化情况 转染 miR-193a-3p 抑制剂后, 胃癌细胞 MGC-803 中的 miR-193a-3p 水平下降, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4A。并且, 免疫印迹结果显示 PAK4 的表达量升高, 而凋亡标志蛋白 cleaved-caspase3 表达量降低, 见图 4B。同时, 胃癌细胞 MGC-803 的凋亡水平下降, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4C。



注: 与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 敲低 miR-193a-3p 后, PAK4 的表达水平和细胞凋亡水平变化

3 讨 论

胃癌是全球范围内与癌症相关死亡的主要原因之一。尽管胃癌的手术和辅助治疗技术不断发展, 但 5 年总生存率仍然很低, 仅为 30%^[6]。胃癌的发病受到多因素的影响, 包括遗传易感性和环境因素。胃癌也会发生一系列的基因改变, 包括抑癌基因、癌基因、细胞黏附分子和生长因子^[7]。为了增加治愈率或改善胃癌患者预后, 明确疾病特有的额外基因和途径是至关重要的。

miRNA 是一种内源性非编码调控 rRNA, 其核苷酸长度为 17~25 bp, 在转录后基因调控中发挥重要作用^[8]。可在各种靶 mRNA 的 3 端非编码区同互补序列结合将导致 mRNA 直接降解或抑制翻译。miRNA 调节基因表达, 促进发育、分化、炎症和癌变。越来越多的证据表明, miRNA 在癌组织和正常组织中的表达存在差异^[9]。由于 miRNAs 在不同类型的组织甚至组织内的细胞类型都具有特异性, 有研究对不同癌症类型的 miRNA 进行了分析, 从而提出了 miRNAs 在临床应用中的诊断和预后价值^[10]。在本

研究中,相比于健康人胃黏膜细胞系 GES-1,miR-193a-3p 在人胃癌细胞系 MKN-45、SGC-7901、MGC-803、SNU16 中低表达,差异有统计学意义($P < 0.05$),并且 MGC-803 的表达量最低。

miR-193a-3p 靶向 PAK4 的 3' 端非编码区。miR-193a 位于 17 号染色体上^[11]。在加工过程中,发夹前体 miRNA 被裂解为成熟的 miR-193a-3p 和 miR-193a-5p。有报道显示,miR-193a-3p 在多种癌症中下调,包括乳腺癌、甲状腺髓样癌、非小细胞肺癌和鳞状细胞肺癌^[12]。在一些癌症类型中,miR-193a 的 DNA 位点的高甲基化与该 miRNA 的表达降低有关,如白血病、口腔癌和非小细胞肺癌^[13]。因此,miR-193a-3p 在相关癌症中的下调发生在转录前,miR-193a 很可能位于 CpG 岛。

PAK 家族成员最初被确定为 Rac 家族小型鸟苷三磷酸酶 1(Rac1)和细胞周期蛋白 42(Cdc42)的分子靶点^[14]。目前,在哺乳动物细胞中已经发现了 PAK 家族的 4 个主要成员。PAK4 最初是根据其作为细胞骨架调节蛋白的作用被识别的^[15]。它是 PAK 家族中第一个被证明与 Cdc42 和丝状伪足形成有关的成员。据报道,PAK1 通过一种独立于其结合 Rac1 的能力和部分独立于其激酶活性的机制来诱导丝状足和膜皱褶^[16]。本研究发现,过表达 miR-193a-3p 后,PAK4 的表达量降低,而凋亡标志蛋白 cleaved-caspase3 表达量升高,胃癌细胞 MGC-803 的凋亡水平上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。敲低 miR-193a-3p 后,PAK4 的表达量升高,而凋亡标志蛋白 cleaved-caspase3 表达量降低,胃癌细胞 MGC-803 的凋亡水平下降($P < 0.05$),差异有统计学意义。近年来,虽然不同的 PAKs 具有不同的功能,但也被证明均在调节凋亡反应方面具有重要的作用,例如 PAK4 可以促使 caspase3 发生切割,激活了细胞凋亡标志蛋白 caspase3,进而有助于细胞凋亡过程中发生形态和膜的变化^[17]。

4 结 论

综上所述,miR-193a-3p 通过靶向调节 PAK4 促进胃癌细胞发生细胞凋亡。

参考文献

- [1] 中国研究型医院学会机器人与腹腔镜外科专业委员会. 胃癌胃切除手术加速康复外科专家共识(2016 版)[J]. 中华消化外科杂志, 2017, 16(1): 14-18.
- [2] 张军, 蔡军. 全程使用 LigaSure 完成腹腔镜下胃癌根治术 D2 淋巴结清扫[J/CD]. 中华普外科手术学杂志(电子版), 2017, 11(6): 465-465.
- [3] WANG K, GAN TY, LI N, et al. Circular RNA mediates cardiomyocyte death via miRNA-dependent upregulation of MTP18 expression[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(6): 1111-1120.
- [4] JIAN B, LI Z, XIAO D, et al. Downregulation of microRNA-193-3p inhibits tumor proliferation migration and chemoresistance in human gastric cancer by regulating PTEN gene[J]. Tumour Biol, 2016, 37(7): 8941-8949.
- [5] HUANG Y, LUO H, LI F, et al. LINC00152 down-regulated miR-193a-3p to enhance MCL1 expression and promote gastric cancer cells proliferation[J]. Biosci Rep, 2018, 38(3): BSR20171607.
- [6] 张志平. 腹腔镜胃癌根治术联合腹腔热灌注化疗治疗 82 例进展期胃癌临床效果分析[J]. 肿瘤学杂志, 2018, 24(6): 631-633.
- [7] 赵百伟, 周志伟, 聂润聪. 遗传性弥漫型胃癌的全胃切除术:一项来自单中心的 41 例患者术后结果[J]. 中华胃肠外科杂志, 2018, 21(2): 227-230.
- [8] 黄俊. 微小 RNA 在糖尿病视网膜病变新生血管生成中的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(5): 478-480.
- [9] 刘士军, 赵龙凤. 微小核糖核酸-122 在肝脏疾病中的作用及相关机制[J]. 中华传染病杂志, 2017, 35(1): 56-58.
- [10] 张丽, 李强. 微小核糖核酸调控胆固醇稳态的研究进展[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2018, 38(5): 329-332.
- [11] SEVIOUR E G, SEHGAL V, MISHRA D, et al. Targeting KRas-dependent tumor growth, circulating tumor cells and metastasis in vivo by clinically significant miR-193a-3p[J]. Oncogene, 2017, 36(10): 1339-1350.
- [12] CHEN K, NGAN H Y, CHAN D W. Abstract LB-324: Methylation-associated silencing of miR-193a-3p promotes ovarian cancer aggressiveness via targeting GRB7 [J]. Theranostics, 2017, 77(13 S): 324-330.
- [13] ZHANG G, ZOU X, LIU Q, et al. MiR-193a-3p functions as a tumour suppressor in human aldosterone-producing adrenocortical adenoma by down-regulating CYP11B2 [J]. Int J Exp Pathol, 2018, 117(4): 655-661.
- [14] LOUIS LIM, C, CLINTON M. Regulation of actin cytoskeleton by Rho-family GTPases and their associated proteins[J]. Semin Cell Dev Biol, 1996, 7(5): 699-706.
- [15] ZHANG H Y, ZHANG J, HAO C Z, et al. LC-0882 targets PAK4 and inhibits PAK4-related signaling pathways to suppress the proliferation and invasion of gastric cancer cells[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(6): 2736.
- [16] MONIKA W H, NATALIA V, EDWARD M, et al. Auto-phosphorylation-dependent degradation of Pak1, triggered by the Rho-family GTPase, Chp[J]. Biochem J, 2007, 404(3): 487-497.
- [17] MIAO Z, MATTHIAS S, HENRIK J. Johansson, et al. Identification of the PAK4 interactome reveals PAK4 phosphorylation of N-WASP and promotion of Arp2/3-dependent actin polymerization[J]. Oncotarget, 2017, 8(44): 77061-77074.