

## · 基础研究 ·

miR-216a 通过靶向调控 PKC $\alpha$  促进胃癌细胞凋亡的研究\*张雪梅<sup>1,2</sup>, 兰 辉<sup>3</sup>, 刘 方<sup>1</sup>, 邓 敏<sup>2</sup>, 梁晓秋<sup>2 $\Delta$</sup> 

(1. 怀化医学高等专科学校基础医学部, 湖南怀化 418000; 2. 南华大学肿瘤研究所, 湖南衡阳 421001; 3. 湖南省怀化市第三人民医院普外科 418000)

**摘要:**目的 本文旨在明确 miR-216a 是否通过靶向调控 PKC $\alpha$  表达而抑制胃癌细胞增殖和促进其凋亡, 从而进一步揭示 miR-216a 的抑癌分子机制。方法 首先构建 PKC $\alpha$  3'UTR-荧光素酶报告载体, 通过荧光素酶报告检测观察 miR-216a 对 PKC $\alpha$  3'UTR-荧光素酶活性的影响; 将 miR-216a 模拟物转染胃癌细胞 MGC-803, 采用 Western blot 检测 PKC $\alpha$  蛋白表达水平; 将 PKC $\alpha$  siRNA 转染 MGC-803, 通过 MTS 细胞增殖活性检测和 Annexin V-FITC/PI 凋亡实验考察 PKC $\alpha$  下调对 MGC-803 增殖和凋亡的影响。结果 荧光素酶报告检测显示, miR-216a 能特异性地与 PKC $\alpha$  3'UTR 结合, 抑制其荧光素酶活性, 下调 36%。过表达 miR-216a 的 MGC-803 PKC $\alpha$  蛋白表达水平降低。siRNA 干扰 PKC $\alpha$  表达能抑制 MGC-803 的增殖和侵袭能力, 它能部分模拟 miR-216a 的抑癌功能。结论 miR-216a 通过靶向 PKC $\alpha$  mRNA 3'UTR 而抑制胃癌细胞增殖和侵袭能力。

**关键词:** 胃肿瘤; 细胞凋亡; miR-216a; PKC $\alpha$ 

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.33.030

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)33-4051-02

**The study of miR-216a induces cell apoptosis by targeting PKC $\alpha$  in gastric cancer\***Zhang Xuemei<sup>1,2</sup>, Lan Hui<sup>3</sup>, Liu Fang<sup>1</sup>, Deng Min<sup>2</sup>, Liang Xiaochu<sup>2 $\Delta$</sup> 

(1. Department of Basical Medicine, Huaihua Medical College, Huaihua, Hunan 418000, China;

2. Cancer Research Institute, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China;

3. Department of General Surgery, Third People's Hospital of Huaihua City, Huaihua, Hunan 418000, China)

**Abstract: Objective** To confirm whether miR-216a suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis by targeting PKC $\alpha$ , thus to reveal molecular mechanism that miR-216a functions as a tumor suppressor in gastric cancer. **Methods** PKC $\alpha$  3' untranslated region(UTR)-luciferase vector was constructed and dual-luciferase reporter gene assay was employed to examine the effect of miR-216a on luciferase activity. MGC-803 cells were transfected with miR-216a mimics, and next Western blotting was performed to detect the expression of PKC $\alpha$  protein. The effects of PKC $\alpha$  downregulation on cell proliferation and apoptosis were observed after PKC $\alpha$  siRNA were transfected into MGC-803 cells. MGC-803 cell proliferation assays were performed when cotransfected with miR-216a mimics. **Results** The result demonstrated miR-216a could bind to the 3'UTR of PKC $\alpha$  and inhibited the luciferase activity, cut the 41%. PKC $\alpha$  protein expressions were significantly down-regulated when miR-216a was overexpressed in MGC-803. siRNA-mediated downregulation of PKC $\alpha$  could suppress the potentials of cell proliferation and induce apoptosis. **Conclusion** miR-216a suppresses cell proliferation and induces apoptosis by targeting PKC $\alpha$  mRNA 3'UTR in gastric cancer.

**Key words:** stomach neoplasms; apoptosis; miR-216a; PKC $\alpha$ 

miRNA 是一种包含 21~25 个核苷酸的内源性非编码小 RNA。miRNA 由高等生物基因组编码, 通过 5'端被称为种子序列的 7 nt 序列与位于靶 mRNA 3'UTR 的 miRNA 调控元件相互作用, 识别靶 mRNA, 引导沉默复合体降解 mRNA 或阻碍其翻译, 从而参与调控个体发育、细胞凋亡、增殖及分化等生命活动<sup>[1]</sup>。研究表明, miR-216a 在肺癌、肝癌、乳腺癌、前列腺癌等多种肿瘤中表达下调<sup>[2-7]</sup>。蛋白激酶 C, 即 PKC $\alpha$  与肿瘤基因的不稳定性和肿瘤细胞的增殖、抗凋亡、侵袭、药物抵抗有关<sup>[8-9]</sup>, 在肿瘤发生、发展中起着重要作用。本研究通过采用生物信息学靶基因预测、荧光素酶报告活性检测、Western blot 等分子生物学技术, 进一步揭示了 miR-216a 的抑癌分子机制。

**1 材料与方**

**1.1 主要材料** miR-216a 模拟物为 Ambion 公司产品。PKC $\alpha$  siRNA 在公司合成, 序列为: 5'-GGG ATC GAA CAA CAA GGA A-3'; PKC $\alpha$  单克隆抗体和  $\beta$ -actin 抗体购自 Epi-

gentek 公司; MTS 细胞增殖/毒性检测试剂盒购自美国公司; Annexin V-FITC/PI-FITC/PI 试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; 双荧光素酶活性检测试剂盒购自美国公司。

**1.2 野生型 PKC $\alpha$  3'UTR-荧光素酶报告载体的构建** 通过 Targetscan 软件预测出的结合位点。根据 PKC $\alpha$  3'UTR 序列设计末端带 Spe I 和 Hind III 酶切位点的特异性引物。以健康志愿者血细胞 DNA 为模板, PCR 扩增 PKC $\alpha$  3'UTR 部分片段。引物序列为 F: 5'-AGA ACT AGT GAG TGT TGG GTG AAT CTG-3'; R: 5'-GTC AAG CTT CTA TCA CGT AAA CTA GCC-3'。构建野生型 PKC $\alpha$  3'UTR-荧光素酶载体 PKC $\alpha$ -Wt。突变型 PKC $\alpha$  3'UTR-荧光素酶报告载体 (pPKC $\alpha$ -Mut) 构建由 Invitrogen 公司合成。

**1.3 荧光素酶活性检测** 将 miR-216a 模拟物和对照分别于荧光素酶报告载体共转染 MGC-803。以转染 pRL-TK 作为标准内质控。转染 36 h 后, 收获细胞。在单光子检测仪检测细

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81107526)。 作者简介: 张雪梅(1978~), 讲师, 硕士, 主要从事肿瘤发病机制研究。  $\Delta$  通讯

作者, E-mail: LiangXiaoqi505@hotmail.com。

胞荧光素酶活性。计算相对荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值。

**1.4 MTS 法检测细胞增殖活性** 取转染后的 MGC-803, 消化后接种细胞于 96 孔板中, 每组设 6 个平行复孔, 放 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。接种后 24、48、72 h 各检测 1 次。检测时每孔加 20 μL MTS 检测试剂, 37 °C 孵育 2 h, 用酶标仪测定 570 nm 波长吸光度值(OD<sub>570</sub>)。实验重复 3 次。

**1.5 Western blot** 提取处理好的 30 μg 蛋白上样, 进行凝胶电泳分离, 然后将蛋白转膜, 封闭后, 加入抗体, 4 °C 过夜。TBST 洗膜 10 min, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 10 min, 化学发光、X 片曝光、显影、定影。

**1.6 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡** 收集细胞后用 PBS 洗涤 2 次; 加入 500 μL 的结合缓冲液重悬细胞; 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL Propidium Iodide; 室温、避光、反应 15 min; 然后流式细胞仪检测。Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道检测; PI 红色荧光通过 PI 通道检测。

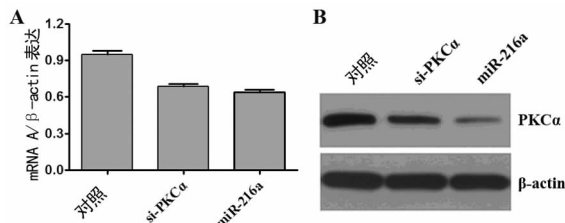
**1.7 qRT-PCR 检测** 体系如下: 总 RNA 1 μg, 10× Buffer 2 μL, dNTP 2 μL, MgCl<sub>2</sub> 4 μL, Oligo dT primer 1 μL, RNasin 0.5 μL, AMV 逆转录酶 0.6 μL, 无酶水水补至 20 μL。反应条件: 42 °C 反应 1 h, 然后 98 °C 5 min 灭活酶反应。qRT-PCR 反应体系如下: SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL, 正向引物(10 μmol/L) 0.4 μL, 反向引物(10 μmol/L) 0.4 μL, cDNA 模板 2.0 μL, 灭菌蒸馏水补至 20 μL。PKCα 引物序列, F: 5'-GCC TAT GGC GTC CTG TTG, R: 5'-TTG GCT GGG TGT TTG GTC。以 β-actin 为内参照, 2<sup>-ΔΔCt</sup> 表示 PKCα mRNA 的相对表达量。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 所有计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-216a 对 PKCα 3' UTR 的荧光酶活性的影响** 在线软件 TargetScan 预测 miR-216a 与 PKCα mRNA 3' UTR 区结合(图 1A)。将 miR-216a 模拟物或对照与 pPKCα-Wt、PKCα-Mut 共转染到 MGC-803 中。转染 48 h 后进行荧光酶活性检测, 结果显示 miR-216a 模拟物明显抑制野生型 PKCα-Wt 的荧光素酶活性, 下调 36% (*P* < 0.05); 而 miR-216a 模拟物对突变型 PKCα-Mut 的荧光素酶活性无明显抑制作用(图 1B)。

物转染 MGC-803 48 h 后, 以转染无关序列为阴性对照, 转染 PKCα siRNA 为阳性对照。通过 Western blot 和 qRT-PCR 检测 PKCα 蛋白和 mRNA 表达水平。qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比, 转染 miR-216b 组 PKCα mRNA 表达水平约下降了 37% (图 2A)。Western blot 检测结果显示, 转染 miR-216a 组 PKCα 蛋白表达较对照组明显降低(图 2B)。



A: Western blot 检测; B: qRT-PCR 检测。

图 2 miR-216a 对 PKCα 蛋白和 mRNA 表达的改变

**2.3 PKCα siRNA 对胃癌细胞增殖和凋亡的影响** 将 PKCα siRNA 转染到 MGC-803 中, 通过 MTS 法检测细胞增殖活性。结果发现, 转染 PKCα siRNA 的 MGC-803 从 48 h 起增殖速度明显减慢, 与对照细胞相比, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。Annexin V-FITC/PI 凋亡实验实验结果显示, 转染 PKCα siRNA 的 MGC-803 细胞较对照细胞凋亡率明显增加 (*P* < 0.05)。

## 3 讨论

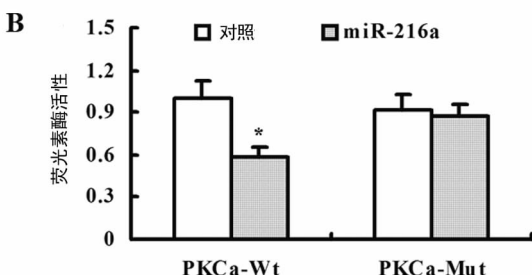
miRNAs 包含 20~24 个核苷酸, 它是一类非编码的小分子单链 RNAs, 具有高度保守性、时间和组织特异性。通过与靶基因 mRNA 完全或不完全地碱基配对, RNA 诱导的沉默复合物可降解靶 mRNA 或抑制翻译, 并且在转录后水平调节靶基因的表达<sup>[12]</sup>。miRNAs 广泛存在于真核生物中, 调节细胞增殖、分化和凋亡。特定的 miRNAs 在不同的肿瘤和不同的阶段高表达或低表达, 这意味着与肿瘤的发生发展以及预后具有一定相关性<sup>[1,12]</sup>。蛋白激酶 C 是存在于细胞质内由钙活化的磷脂依赖性丝/苏氨酸蛋白激酶家族, 广泛参与调节生命过程中的许多生物学事件, 如免疫介导、转录调节、学习与记忆、细胞生长、分化、代谢、疾病发生等过程<sup>[13-14]</sup>。

本研究通过 MTS 证实 miR-216a 可抑制胃癌细胞生长增殖和侵袭能力, 荧光素酶报告载体系统以及 Western blot 等证实了 PKCα 是 miR-216a 调控的直接靶基因, 并且也通过 siRNA 干扰实验证实了下调 PKCα 表达确实能抑制胃癌细胞增殖和侵袭能力, 它能部分模拟 miR-216a 的抑癌功能。结合以往蛋白激酶 C 在肿瘤中的研究成果, 说明 miR-216a 可通过靶向调控 PKCα 表达抑制胃癌细胞增殖和侵袭能力。这进一步揭示了 miR-216a 的抑癌分子机制。自从 lin-4 和 let-7 这两个 miRNA 被人们发现, 随后又有很多 miRNA 被成功地鉴定出来。在人类上皮性恶性肿瘤中, miRNA 表达谱表现出独特的肿瘤特性并能分类不同的肿瘤类型, 鉴别肿瘤的亚型以及区分肿瘤的组织起源<sup>[2]</sup>。miRNA 的独特分类特性与很多肿瘤的结局也有明显联系, 包括对治疗的反应、复发以及总体生存率的预测<sup>[5]</sup>。本研究证实 miR-216a 可能作为抑癌基因参与胃癌的发生、发展, 并且可能成为胃癌诊断和预后判断新一代肿瘤分子标志物及胃癌治疗靶点。

## 参考文献:

- [1] Tang H, Liu X, Wang Z, et al. Interaction of hsa-miR-381 and glioma suppressor LRRC4 is involved in glioma growth[J]. Brain Res, 2011, 1390(1): 21-32. (下转第 4055 页)

predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	
Position 805-811 of PRKCA 3' UTR	5' ... CAUUUUUAUCUCUGGGAGUAUAD ...
hsa-miR-216a	3' AGUGUCAACCGUCGACUCUAAU



A: TargetScan 软件预测 miR-216a 与 PKCα (PRKCA) mRNA 结合; B: miR-216a 抑制 PKCα 3' UTR 的荧光酶活性。

图 1 PKCα 是 miR-216a 的靶基因

**2.2 miR-216a 对 PKCα 蛋白表达的影响** 将 miR-216a 模拟

择性地作用于感觉神经而对运动神经不产生或只产生较小的影响,提示其作为镇痛药物可能具有一定优势。但是在广泛应用于临床之前,仍需对 DEX 的神经毒性进行全面的评估<sup>[3]</sup>。

综上所述,坐骨神经注射 DEX 能够有效减少福尔马林致痛小鼠的疼痛行为,并降低脊髓 c-fos 的表达。本研究为 DEX 作为镇痛药物应用于神经阻滞提供了直接的动物实验依据。

#### 参考文献:

- [1] Gupta P, Whiteside W, Sabati A, et al. Safety and efficacy of prolonged dexmedetomidine use in critically ill children with heart disease[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2012, 13(6):660-666.
- [2] Schnabel A, Reichl SU, Poepping DM, et al. Efficacy and safety of intraoperative dexmedetomidine for acute post-operative pain in children: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Paediatr Anaesth*, 2013, 23(2):170-179.
- [3] Grosu I, Lavand'homme P. Use of dexmedetomidine for pain control[J]. *F1000 Med Rep*, 2010, 2:90.
- [4] Souslova V, Cesare P, Ding Y, et al. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors[J]. *Nature*, 2000, 407(6807):1015-1017.
- [5] Liu H, Zhang HX, Hou HY, et al. Acid solution is a suitable medium for introducing QX-314 into nociceptors through TRPV1 channels to produce sensory-specific analgesic effects[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12):e29395.
- [6] Ayad AE, Masry A. Epidural steroid and clonidine for chronic intractable post-thoracotomy pain: a pilot study[J]. *Pain Pract*, 2012, 12(1):7-13.

- [7] Neil MJ. Clonidine: clinical pharmacology and therapeutic use in pain management[J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2011, 6(4):280-287.
- [8] Gil DW, Cheevers CV, Kedzie KM, et al. Alpha-1-adrenergic receptor agonist activity of clinical alpha-adrenergic receptor agonists interferes with alpha-2-mediated analgesia[J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(2):401-407.
- [9] McCall WD, Tanner KD, Levine JD. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat[J]. *Neurosci Lett*, 1996, 208(1):45-48.
- [10] Henry JL, Yashpal K, Pitcher GM, et al. Evidence for tonic activation of NK-1 receptors during the second phase of the formalin test in the Rat[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(15):6588-6598.
- [11] Gao YJ, Ji RR. C-fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury[J]. *Open Pain J*, 2009, 2(1):11-17.
- [12] Ruan JP, Zhang HX, Lu XF, et al. EphrinBs/EphBs signaling is involved in modulation of spinal nociceptive processing through a mitogen-activated protein kinases-dependent mechanism[J]. *Anesthesiology*, 2010, 112(5):1234-1249.
- [13] Fairbanks CA, Kitto KF, Nguyen HO, et al. Clonidine and dexmedetomidine produce antinociceptive synergy in mouse spinal cord[J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(3):638-647.

(收稿日期:2013-07-07 修回日期:2013-08-08)

(上接第 4052 页)

- [2] Chen PJ, Yeh SH, Liu WH, et al. Androgen pathway stimulates microRNA-216a transcription to suppress the tumor suppressor in lungcancer-1 gene in early hepatocarcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2012, 56(2):632-643.
- [3] 侯宝华,简志祥,崔鹏,等. miR-216a 在胰腺癌组织中的表达及临床意义[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(11):1628-1631.
- [4] Link A, Becker V, Goel A, et al. Feasibility of fecal microRNAs as novel biomarkers for pancreatic cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e42933.
- [5] Ali S, Banerjee S, Logna F, et al. Inactivation of Ink4a/Arf leads to deregulated expression of miRNAs in K-Ras transgenic mouse model of pancreatic cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(10):3373-3380.
- [6] Chen PJ, Yeh SH, Liu WH, et al. Androgen pathway stimulates microRNA-216a transcription to suppress the tumor suppressor in lungcancer-1 gene in early hepatocarcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2012, 56(2):632-643.
- [7] Yu J, Li A, Hong SM, et al. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(4):981-992.
- [8] Kang JH, Toita R, Kim CW, et al. Protein kinase C(PKC)

isozyme-specific substrates and their design[J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(6):1662-1672.

- [9] Hanauske AR, Sundell K, Lahn M. The role of protein kinase C-alpha(PKC- $\alpha$ ) in cancer and its modulation by the novel PKC- $\alpha$ -specific inhibitor aprinocarsen [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(20):1923-1936.
- [10] Chandanos E, Lagergren J. Oestrogen and the enigmatic male predominance of gastric cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2008, 44(16):2397-2403.
- [11] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(1):69-90.
- [12] Tang H, Bian Y, Tu C, et al. The miR-183/96/182 cluster centralizes to regulate oxidative apoptosis and sensitizes cells to chemotherapy in gastric cancers [J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2013, 13(2):221-231.
- [13] Li Y, Guessous F, Zhang Y, et al. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19):7569-7576.
- [14] Ruan BF, Zhu HL. The chemistry and biology of the bryostatins: potential PKC inhibitors in clinical development [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(25):2652-2664.

(收稿日期:2013-07-15 修回日期:2013-08-13)