

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.09.008

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190301.1331.018.html(2019-03-04)

## miRNA-141 对胃癌细胞增殖及侵袭的抑制作用\*

张 诚, 周 超

(上海交通大学医学院附属仁济医院胃肠外科, 上海 200127)

**[摘要]** **目的** 探讨 miRNA-141 对胃癌细胞增殖及侵袭的抑制作用。**方法** 实时荧光定量 PCR(real-time PCR)法检测胃癌细胞 NCI-N87、SGC-7901、MGC-803、MKN-45、HGC-27、BGC-823 及正常人胃黏膜上皮细胞株 GES-1 中 miRNA-141 表达,脂质体将 miRNA-141 mimics 和 miRNA-141 NC 转入胃癌细胞中,48 h 后,real-time PCR 法检测 miRNA-141 表达,甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞活力,膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)流式双染检测细胞凋亡,Transwell 实验检测细胞侵袭能力,Western blot 检测增殖细胞核抗原(PCNA)、c-myc、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 表达及磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路激活情况。**结果** 胃癌细胞 NCI-N87、SGC-7901、MGC-803、MKN-45、HGC-27、BGC-823 中 miRNA-141 相对表达水平( $2.05 \pm 0.20$ 、 $1.76 \pm 0.17$ 、 $1.04 \pm 0.10$ 、 $1.23 \pm 0.12$ 、 $0.89 \pm 0.09$ 、 $0.45 \pm 0.04$ )明显低于 GES-1 中( $2.87 \pm 0.30$ )的表达水平( $P < 0.01$ )。与 miRNA-141 NC 组比较,miRNA-141 mimics 组 miRNA-141 表达水平明显升高,细胞活力下降,细胞凋亡率升高,细胞侵袭能力降低,PCNA、c-myc、MMP-2、MMP-9、PI3K 及磷酸化 AKT(p-AKT)表达水平下调,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** 上调 BGC-823 胃癌细胞中 miRNA-141 表达水平后能明显抑制癌细胞增殖与侵袭,可能与抑制阻断 PI3K/AKT 信号通路有关。

**[关键词]** miRNA-141; 胃肿瘤; 细胞增殖; 侵袭

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2019)09-1476-04

### Inhibition of miRNA-141 on proliferation and invasion of gastric cancer cells\*

ZHANG Cheng, ZHOU Chao

(Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the inhibition of miRNA-141 on proliferation and invasion of gastric cancer cells. **Methods** Expression of miRNA-141 in gastric cancer cell NCI-N87, SGC-7901, MGC-803, MKN-45, HGC-27, BGC-823 and GES-1 in normal human gastric epithelial cell was examined by real-time PCR. miRNA-141 mimics and miRNA-141 NC were transfected into gastric cancer cells by liposome. Cell viability was measured by MTT assay. Cell apoptosis was measured by Annexin V-FITC/PI flow cytometry. Cell invasion was measured by transwell method. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), c-myc, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), the activation of phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) was measured by Western blot. **Results** The expression of miRNA-141 in NCI-H460, NCI-H1975, NCI-H446, A549, NCI-H1299, NCI-H157 cell ( $2.05 \pm 0.20$ ,  $1.76 \pm 0.17$ ,  $1.04 \pm 0.10$ ,  $1.23 \pm 0.12$ ,  $0.89 \pm 0.09$ ,  $0.45 \pm 0.04$ , respectively) was lower than that in GES-1 cell ( $2.87 \pm 0.30$ ). In the miRNA-141 mimics group, the cell viability reduced, the cell apoptotic rate increased, and the cell invasion ability decreased when compared with the miRNA-141 NC group ( $P < 0.01$ ). The expression of PCNA, c-myc, MMP-2, MMP-9, PI3K, p-AKT was down-regulated in the miRNA-141 mimics group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The up-regulation of miRNA-141 in gastric cancer cells could inhibit the cell proliferation and invasion, which might be related to the inhibition of PI3K/AKT signaling pathway.

**[Key words]** miRNA-141; stomach neoplasms; cell proliferation; invasion

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤,尤其是农村发病率极高其病死率较高,特别是在发展中国家,我国胃癌死亡病例数占全世界约 40%。虽然近年来随着医

学影像技术手段发展,胃癌的治愈率有所提高,但是早期诊断率仍极低,不及 20%,使得众多患者一确诊基本处于中晚期,预后极差<sup>[1]</sup>。因此进一步的探寻胃

\* 基金项目:上海交通大学医学院科技基金项目(2016XJ026)。

作者简介:张诚(1983—),住院医师,硕士,主要从事胃肠道肿瘤及功能疾病的诊治研究。

癌早期诊断标记物对于胃癌的治疗及预后将具有重大意义。miRNA 是一类长度为 21~23 nt 的在真核生物钟高度保守的非编码 RNA 小分子,能与靶基因的 3'非翻译区特异性结合,在转录水平上调控靶基因表达,进而参与细胞的生命过程。miRNA 与肿瘤的发生、发展密切相关,近年来引起了众多学者的兴趣,miRNA-200 家族就是一种<sup>[2-4]</sup>。miRNA-200 家族包括 5 个成员(miRNA-200a, miRNA-200b, miRNA-200c, miRNA-141, miRNA-429),研究显示此家族成员在不同的肿瘤组织,不同的亚细胞中表达趋势不一致,在众多肿瘤组织中高表达,而在少数的肿瘤组织或细胞中低表达<sup>[5]</sup>。不过目前已有研究报道证实 miRNA-200 家族成员在胃癌组织中低表达<sup>[6-7]</sup>,但在胃癌的发生、发展的具体作用机制尚不清楚,因此本研究以 miRNA-200 家族成员之一的 miRNA-141 为研究对象,探讨 miRNA-141 在胃癌细胞增殖、侵袭中的作用及相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株** 人胃癌细胞 NCI-N87、SGC-7901、MGC-803、MKN-45、HGC-27、BGC-823 及正常人胃黏膜上皮细胞株 GES-1 购于中国科学院上海细胞库。

**1.1.2 主要试剂和仪器** 胎牛血清,DMEM 培养基购于美国 Hyclone 公司;Trizol 总 RNA 提取试剂盒、Lipofectamine™ 3000 脂质体、反转录试剂盒(第一链 cDNA 合成试剂盒)购于大连宝生生物技术有限公司;miRNA-141 mimics 和 miRNA-141 NC 购于广州锐博技术有限公司;二喹啉甲酸(BCA)试剂盒、膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)流式双染试剂盒购于碧云天生物技术有限公司;Transwell 小室购于美国 Corning 公司;兔抗人增殖细胞核抗原(PCNA)、c-myc、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)、磷酸化 AKT(p-AKT)多克隆抗体购于美国 Abcam 公司。MK3 酶标仪购自美国 thermo 公司;Stepone plus 荧光定量 PCR 购自美国 ABI 公司;FACSCalibur 型流式细胞仪;AF6000 型荧光显微镜购于德国莱卡公司;GelDoc XR System 凝胶成像系统购于伯乐生命科学产品上海有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测 miRNA-141 的表达** 微量紫外分光光度计检测 RNA 纯度,当检测出的 RNA 纯度( $OD_{260nm}/OD_{280nm}=1.8$ )良好时候,根据反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,基于 SYBR Green I 荧光分析的反转录 PCR(RT-PCR)分析,最后根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析 miRNA-141 水平。miRNA-141 上游引物:5'-GGU AGA AAU GGU CUG UCA CAA U-3',下游引物:5'-AAU GCC UAA CAU GCA GUC GAU G-3',GAPDH 上游引物:5'-AGC CAC ATC GCT CAG ACA-3',下游引物:5'-TGG ACT CCA CGA CGT ACT-3'。

**1.2.2 miRNA-141 mimics 和 miRNA-141 NC 的转染** 当胃癌细胞生长程度达到 50%左右时候,将用 Opti-MEM 稀释好的 Lipofectamine™ 3000 与 miRNA-141 mimics 和 miRNA-141 NC 混匀,加入到细胞中,6 h 将细胞培养板中的液体吸走弃掉,换成含 10% 胎牛血清的培养基,继续培养 48 h,利用 RT-PCR 法检测转染效果。

**1.2.3 甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞活力** 将胃癌细胞接种到 96 孔板,细胞贴壁后,按“1.2.2”转染 48 h 后,加入 MTT 孵育 4 h 后,每个 96 孔板细胞中加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砷,并将 96 板置于微量振荡器上使结晶物溶解,于酶标仪波长 560 nm 处测 OD 值。

**1.2.4 Annexin V-FITC/PI 流式细胞法检测细胞凋亡** 将胃癌细胞接种到 6 孔板,细胞贴壁后,按“1.2.2”转染 48 h 后,收集细胞,并按照 Annexin V-FITC/PI 流式细胞说明书操作按顺序加入结合缓冲液、Annexin V-FITC 及 PI 染液,最后在流式细胞仪上进行细胞凋亡分析。

**1.2.5 Transwell 法检测细胞侵袭能力** Transwell 小室平铺 Matrigel 胶,Transwell 下室加入含 10% 胎牛血清的培养基。将按“1.2.2”转染 48 h 后的胃癌细胞制成单细胞悬液接种到 Transwell 上室,继续培养 48 h 后,将小室取出来,用棉签擦去 Transwell 上室细胞,用多聚甲醛固定 Transwell 下室细胞,结晶紫染色,在倒置显微镜下观察细胞侵袭情况并计数。

**1.2.6 Western blot 检测细胞中 MMP-2、MMP-9 表达** 将胃癌细胞接种到 6 孔板,细胞贴壁后,按“1.2.2”转染 48 h 后,在 4  $^{\circ}$ C 条件下收集、裂解细胞,并得到细胞中的总蛋白。BCA 试剂盒测定总蛋白浓度,取 30 g 样品上样,进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳 1~2 h,转聚偏氟乙烯(PVDF)膜 30~50 min。2%的 BSA 室温下孵育 1 h,一抗溶液(兔抗人 PCNA、c-myc、MMP-2、MMP-9、PI3K、AKT、p-AKT 多克隆抗体)4  $^{\circ}$ C 过夜孵育,第二天在室温下孵育二抗,最后根据化学发光免疫试剂盒说明书在凝胶成像系统中曝光各蛋白条带,并分析条带灰度值。

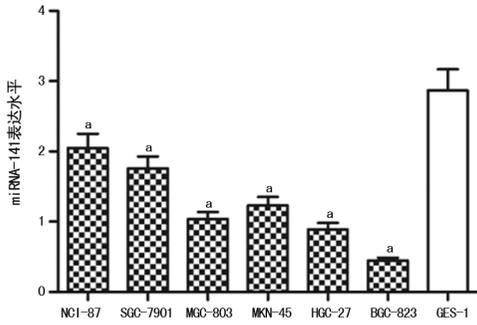
**1.3 统计学处理** 数据均采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组细胞株中 miRNA-141 表达水平比较** miRNA-141 在胃癌细胞 NCI-N87、SGC-7901、MGC-803、MKN-45、HGC-27、BGC-823 中的表达水平( $2.05 \pm 0.20$ 、 $1.76 \pm 0.17$ 、 $1.04 \pm 0.10$ 、 $1.23 \pm 0.12$ 、 $0.89 \pm 0.09$ 、 $0.45 \pm 0.04$ )明显低于正常人胃黏膜上皮细胞 GES-1( $2.87 \pm 0.30$ )表达水平( $P < 0.01$ ),其中在 BGC-823 表达水平最低,且差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 1。

**2.2 miRNA-141 mimics 组和 miRNA-141 NC 组 miRNA-141 表达水平比较** miRNA-141 mimics 组、

miRNA-141 NC 组 miRNA-141 相对表达水平分别为  $2.38 \pm 0.21$ 、 $0.39 \pm 0.04$ ，miRNA-141 mimics 组中 miRNA-141 表达水平较 miRNA-141 NC 组明显上调 ( $P < 0.01$ )。



<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 GES-1 比较

图 1 miRNA-141 在各组细胞中的表达水平比较

**2.3 miRNA-141 mimics 对 BGC-823 细胞活力及凋亡情况的影响** miRNA-141 mimics 组细胞活力较 miRNA-141 NC 组明显降低 ( $P < 0.01$ )。miRNA-141 mimics 组细胞早期与晚期凋亡率较 miRNA-141 NC 组 ( $0.68 \pm 0.07$ ) 明显提高 ( $P < 0.01$ )，见表 1。

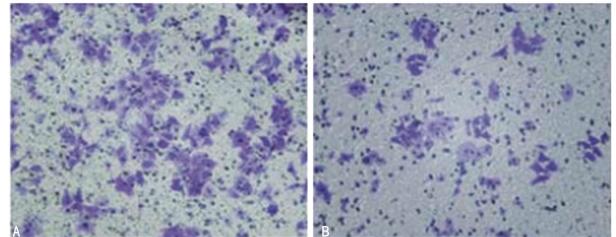
**2.4 miRNA-141 mimics 对 BGC-823 细胞侵袭能力的影响** miRNA-141 mimics 组、miRNA-141 NC 组细胞侵袭数目分别为 ( $43.79 \pm 4.38$ )、( $178.44 \pm$

$17.50$ ) 个，miRNA-141 mimics 组细胞侵袭数目较 miRNA-141 NC 组明显降低 ( $P < 0.01$ )，见图 2。

表 1 miRNA-141 mimics 对 BGC-823 细胞活力及凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞活力(OD 值)	早期凋亡(%)	晚期凋亡(%)
miRNA-141 NC 组	$0.68 \pm 0.07$	$3.22 \pm 0.30$	$2.47 \pm 0.24$
miRNA-141 mimics 组	$0.37 \pm 0.04^a$	$20.56 \pm 2.25^a$	$16.79 \pm 1.60^a$

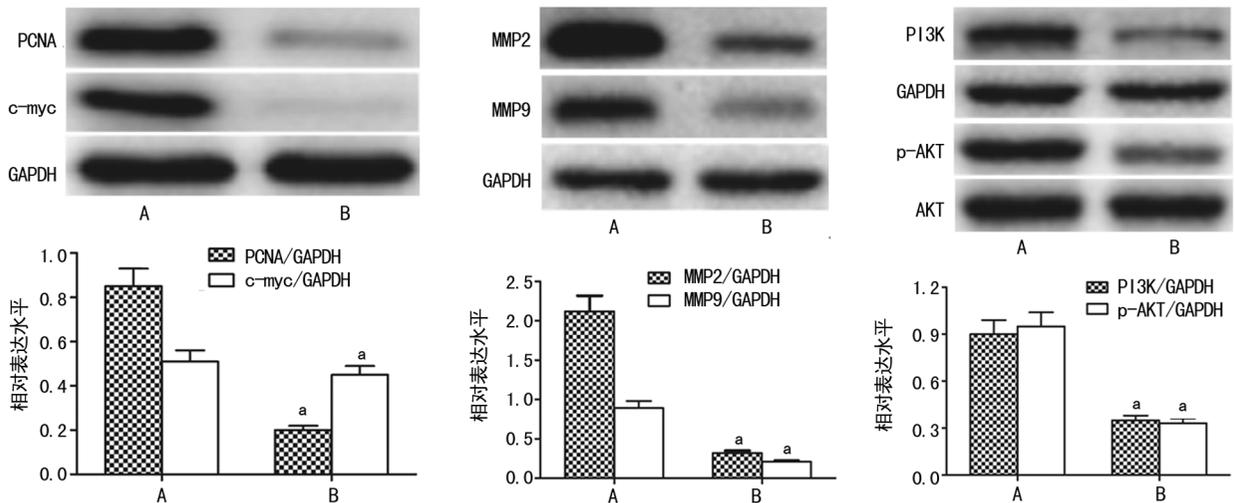
<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 miRNA-141 NC 组比较



A: miRNA-141 NC 组; B: miRNA-141 mimics 组

图 2 倒置显微镜下两组 BGC-823 细胞侵袭能力显像 ( $\times 200$ )

**2.5 两组 BGC-823 细胞中 PCNA、c-myc 等表达水平比较** miRNA-141 mimics 组中 PCNA、c-myc、MMP-2、MMP-9、PI3K、p-AKT 表达水平较 miRNA-141 NC 组明显下调，差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，见图 3。



A: miRNA-141 NC 组; B: miRNA-141 mimics 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 miRNA-141 NC 组比较

图 3 两组 BGC-823 细胞中 PCNA、c-myc 等表达水平比较

### 3 讨论

miRNA-200 家族是近年的热点研究 miRNA，此家族包括 5 个成员，分为两个亚族，不同亚族之间既具有相同的功能，也具有特殊性。其中 miRNA-141 位于人 12 号染色体，在肝癌、肺癌、结直肠癌及胰腺癌等肿瘤中表达失调，并与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[8]</sup>。同时 GOMES 等<sup>[9]</sup>通过采用自组织映射图 (self-organizing maps) 鉴定出胃癌组织中的 miRNA 表达谱，miRNA-141 就是其中一种失调的 miRNA。后来 LU 等<sup>[10]</sup>研究证实 miRNA-141 在胃癌组织中低表达，并与肿瘤分化、TNM 分期、淋巴结转移及远处

转移正相关。ZHANG 等<sup>[11]</sup>研究利用 miRNA 微阵列证实包括 miRNA-141 在内的 5 个 miRNA 在胃癌血浆中低表达。而且 ZHOU 等<sup>[12]</sup>研究证实 miRNA-141 不仅在胃癌组织中低表达，当 miRNA-141 过表达后能够与 MEG3 相互作用或者靶向调控 E2F3 表达进而参与胃癌的发生。充分说明 miRNA-141 与胃癌的发生、发展密切相关，但是 miRNA-141 对胃癌细胞的增殖及侵袭的影响还少见报道，所以本研究将对此展开探讨。本研究首先利用 RT-PCR 法检测胃癌细胞 NCI-N87、SGC-7901、MGC-803、MKN-45、HGC-27、BGC-823 及正常人胃黏膜上皮细胞株 GES-1 中

miRNA-141 表达,结果表明胃癌细胞中的 miRNA-141 表达低于 GES-1 细胞,与 miRNA-141 在胃癌组织及癌旁组织中的表达趋势一致<sup>[9-12]</sup>。接着利用脂质体将 miRNA-141 mimics 及 miRNA-141 NC 转染到 BGC-823 细胞中,RT-PCR 法证实转染成功。而且 MTT 法及 Annexin V-FITC/PI 流式双染结果表明 miRNA-141 mimics 能明显地降低 BGC-823 细胞活力,提高细胞早期及晚期凋亡率,与 miRNA-141 在其他肿瘤细胞中的作用效果一致<sup>[13-14]</sup>。另外本研究还利用 Transwell 法检测 miRNA-141 mimics 对 BGC-823 细胞侵袭能力的影响,结果表明 miRNA-141 mimics 能明显地抑制细胞的侵袭能力。从而说明 miRNA-141 mimics 能明显抑制 BGC-823 细胞活力及侵袭能力,同时诱导细胞凋亡。

肿瘤细胞的无限增殖受多种蛋白的调控,PCNA 就是其中一种。PCNA 是从系统性红斑狼疮中发现的与 DNA 的复制密切相关的一种核蛋白质,能推动细胞的增殖。另外癌基因及抑癌基因在细胞的增殖与凋亡中亦起着重要的调控作用。C-myc 被认为是癌基因,能促进细胞分裂,使细胞获得无限增殖的可能。MMPs 蛋白水解酶所介导的细胞外基质的降解是肿瘤细胞迁移、侵袭、转移的必经过程之一。MMP-2 不仅能够通过降解细胞外基质成分促进癌细胞扩散,还能够通过诱导血管新生进一步的促进肿瘤细胞扩散浸润。MMP-9 是分子量最大的 MMP,能够降解包括 IV 在内的几乎所有的细胞外基质成分。因此本研究继续利用 Western blot 检测 miRNA-141 mimics 对 BGC-823 细胞中 PCNA、c-myc、MMP-2 及 MMP-9 表达的影响,结果表明 miRNA-141 mimics 能明显下调 PCNA、c-myc、MMP-2 及 MMP-9 表达,继而抑制细胞的增殖与侵袭。

PI3K/AKT 信号通路又被称为抗凋亡信号通路,在众多肿瘤组织中被高度激活。当 PI3K 受到上游信号刺激后,能使磷脂酰二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)的 3' 羟基磷酸化,转化为三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3),进而使 AKT 结构发生变化并在丝氨酸/苏氨酸位点磷酸化,p-AKT 进一步的调控下游靶蛋白(Bcl-2、MMPs)的表达,参与细胞的增殖、凋亡、侵袭等生物学行为。而且有研究证实 PI3K/AKT 信号通路拮抗剂 PH 域富含亮氨酸重复蛋白磷酸酶(PHLPP)1 及 PHLPP2 能扭转 miRNA-141 在非小细胞肺癌细胞中的作用<sup>[15]</sup>,提示 miRNA-141 与 PI3K/AKT 信号通路之间具有明显相关性。所以本研究继续利用 Western blot 检测 miRNA-141 mimics 对 BGC-823 细胞中 PI3K/AKT 信号中相关蛋白表达的影响,结果表明 miRNA-141 mimics 能明显的下调 PI3K 及 p-AKT 表达。

综上所述,miRNA-141 在胃癌细胞 NCI-N87、SGC-7901、MGC-803、MKN-45、HGC-27、BGC-823 中的表达水平低于正常人胃黏膜上皮细胞株 GES-1 中表达水平,提高 BGC-823 细胞中 miRNA-141 表达水平,能明显降低细胞活力,提高细胞凋亡率,抑制细胞

侵袭,并下调 PCNA、c-myc、MMP-2 及 MMP-9 表达,可能与抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。

## 参考文献

- [1] 吴楠蝶,魏嘉,刘宝瑞. 胃癌分子靶向治疗的研究进展[J]. 医学研究生学报,2014,27(12):1318-1322.
- [2] 汤佳音,房静远. 非编码 RNA 在胃癌诊治中的研究进展[J]. 肿瘤,2014,34(6):574-578.
- [3] WANG Q X, ZHU Y Q, ZHANG H, et al. Altered miRNA expression in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(3):933-944.
- [4] 张建芳,张水文,李建华,等. 卵巢 miRNA 的表达与功能研究进展[J]. 中国比较医学杂志,2013,23(8):67-71.
- [5] SOO L J, YOUNG-HO A, SUNG W, et al. Prognostic role of the microRNA-200 family in various carcinomas: a systematic review and Meta-analysis[J]. Biomed Res Int, 2017(2017):1-11.
- [6] CHANG L, GUO F, HUO B, et al. Expression and clinical significance of the microRNA-200 family in gastric cancer[J]. Oncol Lett, 2015, 9(5):2317-2324.
- [7] SONG F, YANG D, LIU B, et al. Integrated microRNA network analyses identify a poor-prognosis subtype of gastric cancer characterized by the miR-200 family[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(4):878-889.
- [8] FENG B, WANG R, CHEN L B. Review of miR-200b and cancer chemosensitivity[J]. Biomed Pharmacother, 2012, 66(6):397-402.
- [9] GOMES L L, MOREIRA F C, HAMOY I G, et al. Identification of miRNAs expression profile in gastric cancer using self-organizing maps (SOM) [J]. Bioinformatics, 2014, 10(5):246-250.
- [10] LU Y B, HU J J, SUN W J, et al. Prognostic value of miR-141 downregulation in gastric cancer[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4):17305-17311.
- [11] ZHANG Z Z, WANG C J, NIU L, et al. Analysis of plasma microRNAs to identifying early diagnostic molecule for gastric cancer[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(3):3700-3706.
- [12] ZHOU X, JI G, KE X, et al. MiR-141 inhibits gastric cancer proliferation by interacting with long noncoding RNA MEG3 and down-regulating E2F3 expression[J]. Dig Dis Sci, 2015, 60(11):3271-3282.
- [13] LI J Z, LI J, WANG H Q, et al. MiR-141-3p promotes prostate cancer cell proliferation through inhibiting kruppel-like factor-9 expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482(4):1381-1386.
- [14] HE P, ZHANG Z, HUANG G, et al. miR-141 modulates osteoblastic cell proliferation by regulating the target gene of lncRNA H19 and lncRNA H19-derived miR-675 [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(4):1780-1788.
- [15] MEI Z, HE Y, FENG J, et al. MicroRNA-141 promotes the proliferation of non-small cell lung cancer cells by regulating expression of PHLPP1 and PHLPP2[J]. FEBS Lett, 2014, 588(17):3055-3061.