

# miRNA-296-5p 靶向 BOK 抑制胃癌细胞的凋亡

汤国军 吴俊 吴章强 凌英杰 童骏 胡丛岗

**[摘要]** 目的 分析 miRNA-296-5p 在癌旁组织和肿瘤组织中的表达差异,并研究 miRNA-296-5p 抑制胃癌细胞凋亡的机制。方法 采用实时荧光定量 PCR 检测 5 例胃癌患者胃癌组织和相应的癌旁组织中的 miRNA-296-5p 的表达水平;应用 miRNA-296-5p mimic、miRNA-296-5p inhibitor 和阴性对照分别转染 BGC-823 和 MGC-803 细胞,通过 CCK-8 检测细胞的增殖水平,通过流式细胞术检测细胞凋亡水平;采用蛋白印迹技术检测 BOK 蛋白表达水平;采用双荧光素酶实验验证 miRNA-296-5p 和 BOX 之间的关系。结果 与癌旁组织相比,miRNA-296-5p 在胃癌组织中明显升高 ( $t=-6.37, P<0.05$ ),且与 BOK 蛋白表达呈负相关。miRNA-296-5p 过表达之后,明显抑制 MGC-803 和 BGC-823 细胞凋亡;miRNA-296-5p 表达下降之后,MGC-803 和 BGC-823 细胞的凋亡水平明显升高。实时荧光定量 PCR 和 Western-blot 结果表明 miRNA-296-5p 过表达之后,BOK 蛋白的表达水平明显降低,而 miRNA-296-5p 被抑制之后,BOK 蛋白的表达水平明显升高。双荧光素酶报告实验显示,miRNA-296-5p 靶向 BOK 的 miRNA 的 3' 非编码区。结论 相较于癌旁组织,miRNA-296-5p 在胃癌组织中高表达,通过抑制 BOK 的蛋白水平实现促进胃癌进展,从而降低胃癌细胞的凋亡水平。

**[关键词]** 胃癌; miRNA-296-5p; BOK; 凋亡

**miRNA-296-5p inhibits apoptosis of gastric cancer cells through targeting BOK** TANG Guojun, WU Jun, WU Zhangqiang, et al. Department of Gastrointestinal Surgery, Zhejiang Jinhua Guangfu Cancer Hospital, Jinhua 321000, China.

**[Abstract]** **Objective** To detect the expression of miRNA-296-5p in adjacent tissues and tumors and explore the mechanism of miRNA-296-5p inhibiting the gastric cancer (GC) cells apoptosis. **Methods** The expressions of miRNA-296-5p in 5 gastric cancer tissues and adjacent tissues were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. BGC-823 and MGC-803 cells were transfected with miRNA-296-5p mimic, microRNA-296-5p inhibitor and negative control respectively. The proliferation level of cells was detected by CCK-8, and the apoptosis level of cells were detected by flow cytometry. Western blotting was used to detect the expression of BOK protein. Double fluorescent plum assay was taken to verify the relationship of miRNA-296-5p and BOX. **Results** The expression level of miRNA-296-5p in tumor tissue was higher than that in adjacent tissues ( $t=-6.37, P<0.05$ ), and it was negatively related to the expression of BOK protein. Overexpressed miRNA-296-5p significantly inhibited the apoptosis of MGC-803 and BGC-823 cells, while inhibited miRNA-296-5p significantly increased the apoptotic of MGC-803 and BGC-823 cells. The results of realtime-PCR and Western-blot showed that overexpressed miRNA-296-5p significantly reduced the expression level of BOK protein, and vice versa. The double luciferase report experiment showed that the miRNA-296-5p directly target the 3' UTR region. **Conclusion** Compared with the adjacent tissues, miRNA-296-5p is highly expressed in gastric cancer. Its role in promoting the development of GC was achieved by inhibiting BOK protein, so thus reducing the apoptotic level of gastric cancer cells.

**[Key words]** gastric cancer; miRNA-296-5p; BOK; apoptosis

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.002.005

基金项目:金华市科技研究计划公益项目(2017-4-050)

作者单位:321000 浙江金华,浙江金华广福肿瘤医院胃肠外科

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤,在恶性肿瘤中的发病率居于第4位,但却是癌症相关的第1位死亡原因<sup>[1]</sup>。然而,其内在机制尚需要进一步研究。

miRNAs 是一类长度介于 21~23nt 的非编码 RNA, 通过结合于 mRNA 的 3' 非编码区来抑制或者降解靶基因的 mRNA。有研究指出, miRNA-27b 可以抑制 B 淋巴瘤细胞的增殖, 并且通过 PI3K/AKT 通路抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[2]</sup>, 而在胃黏膜上皮细胞的研究中显示, miRNA-101 可以通过 Nrf2/ARE 通路控制细胞的凋亡和增殖水平<sup>[3]</sup>。

miRNA-296-5p 来自于人 20 号染色体 q13.32 的基因位点, 是细胞增殖、凋亡和血管生成的重要调节因子<sup>[4]</sup>。在既往研究中显示, miRNA-296-5p 能够促进子宫、前列腺、肺部和乳腺等部位恶性肿瘤的发展<sup>[5,6]</sup>。因此, 本次研究探究 miRNA-296-5p 在癌细胞中的作用, 并初步探寻其可能的机制, 明确胃癌的发生发展机制, 为胃癌的临床治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

1.1 实验标本 选择 2018 年 1 月至 6 月期间在浙江金华广福肿瘤医院行胃癌根治术手术患者 5 例, 其中男性 3 例、女性 2 例; 年龄 40~65 岁, 平均年龄

(48.80±9.52) 岁。临床标本在手术室收集后立即置于 -80 °C 保存, 共 10 份, 其中 5 份胃癌标本和 5 份癌旁组织。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌细胞株 MGC-803 和 BGC-823 购自上海生科院典藏细胞库, 用 DMEM 培养基和 10% 胎牛血清, 100 U/ml 双抗 (英潍捷基) 培养, 放置在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中。

1.2.2 细胞转染 加入 2 μmol/L miRNA-296-5p mimic (由中国锐博生产) 或者 miRNA-296-5p inhibitor (由中国锐博生产) 和阴性对照 (由中国锐博生产) 和 Lipofectamine 2 000 (由 thermo scientific 生产) 转染胃癌细胞株。

1.2.3 RNA 提取和实时荧光定量 PCR 应用 miR-Neasy Mini Kit (由 Qiagen 生产) 提取 RNA。miRNA-296-5p 和 U6 逆转录和荧光定量 PCR 的引物由中国锐博生物科技公司生产。BOK 的引物序列见表 1。逆转录试剂盒应用 PrimeScript RT reagent kit (由 TaKaRa 生产)。U6 和 actin 的表达作为内参。

表 1 BOK 的引物序列

引物	上游	下游
BOK	CCGAGATCATGGACGCCTTT	TGCCTGCAGAGAAGATGTGG
actin	CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	GCTGTACCTCCACCGTTCC

1.2.4 细胞增殖实验 应用 CCK-8 进行细胞增殖实验, MGC-803 细胞和 BGC-823 细胞 (3×10<sup>3</sup> 个/孔) 被种植在 96 孔板中, 每个孔加入 100 ml DNME 培养基。并在 0 h、24 h、48 h、72 h 在每个孔中加入 10 μl CCK-8 溶液, 在 450 nm 检测吸光度。

1.2.5 细胞凋亡检测 细胞凋亡检测采用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (由 BD Biosciences 生产)。收集 5×10<sup>4</sup> 个细胞, 并按照指导手册进行染色, 并在流式细胞仪上进行检测。所有的实验进行 3 次独立重复实验。

1.2.6 双荧光素酶实验 BOK 的 3' 非编码区和突变的 BOK 3' 非编码区被克隆进 pGL3/luciferase 载体的下游。用 miRNA-296-5p mimic+pGL3/luciferase 载体和阴性对照+pGL3/luciferase 载体加入 MGC-803 细胞, 48 h 后收集细胞, 磷酸盐缓冲液冲洗 3 次后裂解细胞, 收集 10 μl 上清液混合 100 μl Luciferase Assay Reagent II, 检测荧光强度, 之后加入 100 μl stop glo reagent, 检测海肾荧光强度。所有的实验进行 3 次独立重复实验。

1.2.7 蛋白印迹实验 细胞收集后用细胞裂解液裂

解, 每个蛋白孔道加入 20 μg 蛋白, 并用 8% SDS-PAGE 胶分离, 并把蛋白转移到 PVDF 膜, 之后用 5% 的脱脂牛奶在室温下封闭 1 h, 用 TBST 洗脱 3 次, 每次 5 分钟, 用 BOK 抗体孵育 (1:1000 稀释), 一抗稀释液在 4°C 与 PVDF 膜过夜结合。之后用 anti-rabbit IgG 在室温下结合 2 h。内参选用 β-actin。根据曝光液 enhanced chemiluminescent substrates 使用说明书进行蛋白检测。所有的实验进行 3 次独立重复实验。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 的形式描述, 计量资料采用 *t* 检验, 计数资料采用  $\chi^2$  检验。设  $P < 0.05$  为差异具统计学意义。

## 2 结果

2.1 miRNA-296-5p 在胃癌组织和癌旁组织中的表达比较 miRNA-296-5p 在胃癌组织中的表达水平为 2.90±0.36, 明显高于在癌旁组织中的表达水平 (1.02±0.03), 差异有统计学意义 ( $t = -6.37, P < 0.05$ )。

2.2 miRNA-296-5p 对胃癌细胞增殖和凋亡的影响 见图 1、封二图 2

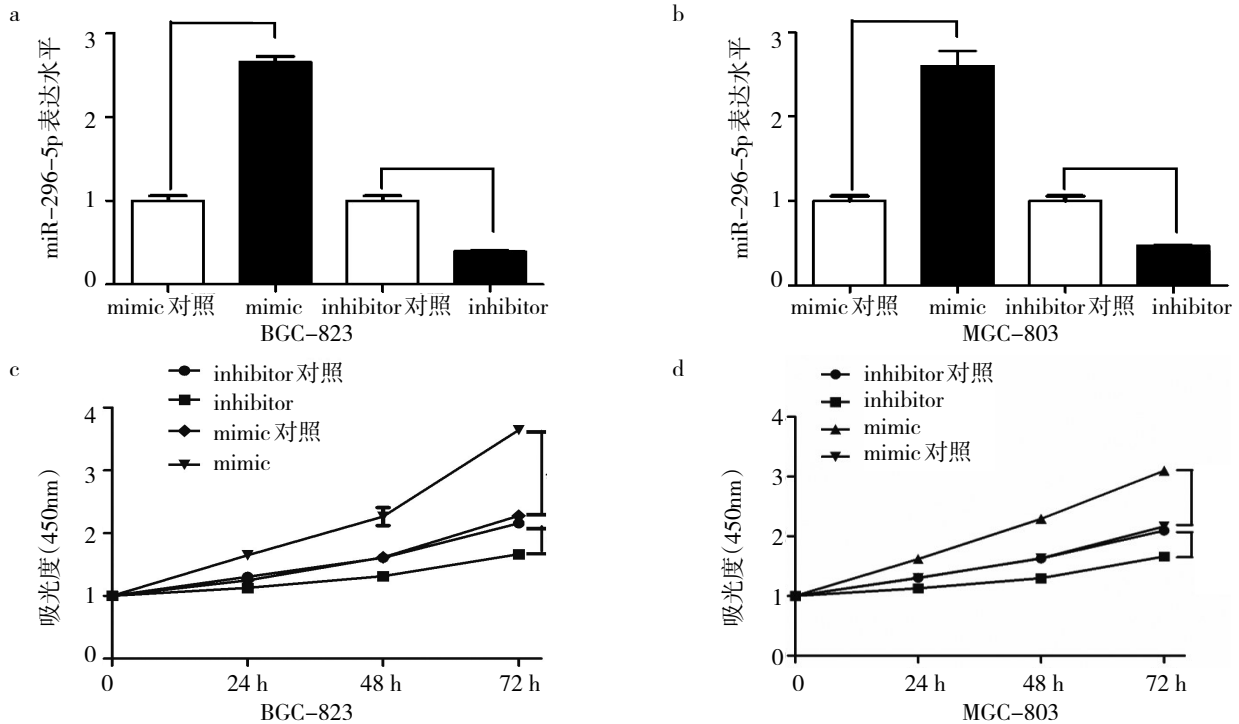


图1 miRNA-296-5p对胃癌细胞增殖的影响

由图1 a、b可见，BGC-823和MGC-803转染miRNA-296-5p mimic、inhibitor及其阴性对照，转染成功。由图1 c和d可见，在BGC-823和MGC-803中上调miRNA-296-5p后，细胞增殖水平明显升高，在BGC-823和MGC-803中下调miRNA-296-5p后，细胞增殖水平明显降低。

由封二图2 a可见，上调miRNA-296-5p后，细胞凋亡水平明显降低；由封二图2 b可见，下调miRNA-296-5p后，细胞凋亡水平明显升高。

2.3 miRNA-296-5p靶向BOK的mRNA的3'非编码区见图2

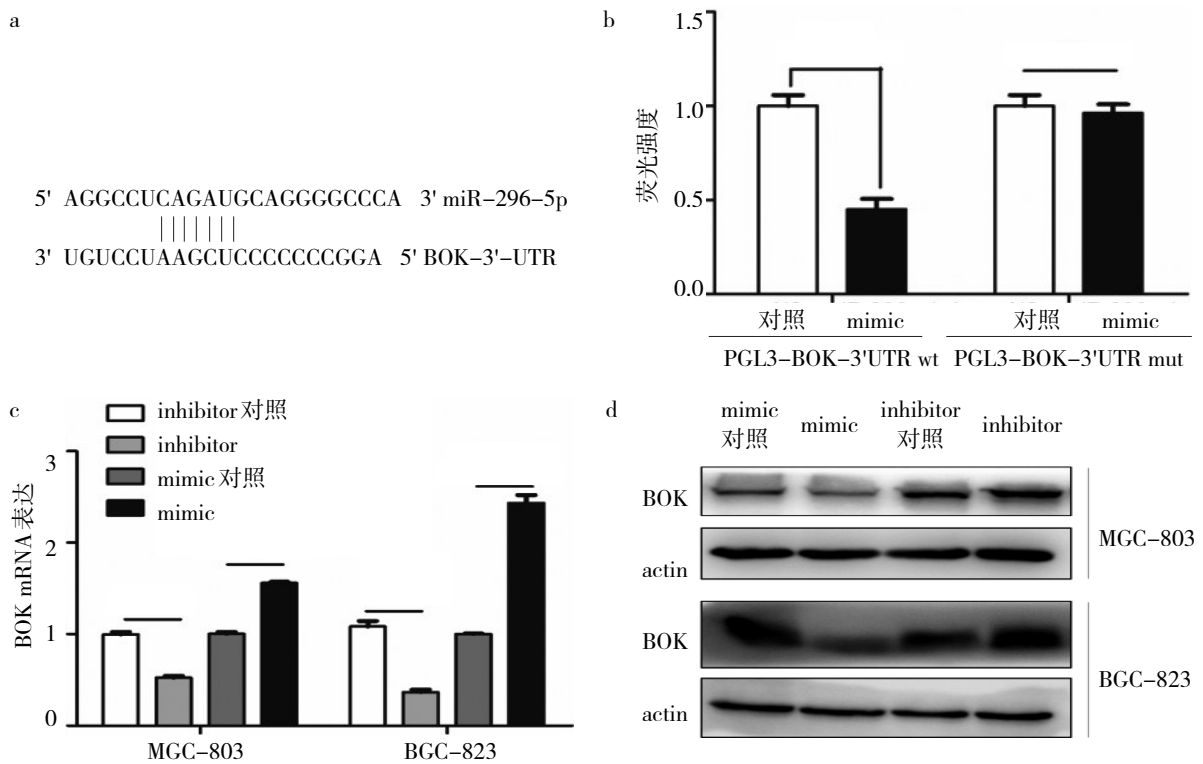


图2 miRNA-296-5p靶向BOK的mRNA的3'非编码区

由图 2 a 可见, BOK 可能是 miRNA-296-5p 的靶基因。由图 2 b 可见, 相比较于阴性对照, BOK 的 3' 非编码区突变之后荧光强度没有改变。由图 2 c 可见, 在 MGC-823 和 BGC-803 细胞中, 上调 miRNA-296-5p 之后, BOK 的 mRNA 表达水平降低, 相反, 下调 miRNA-296-5p 之后, BOK 的 mRNA

的表达水平升高; 由图 2 d 可见, 过表达 miRNA-296-5p 之后, BOK 蛋白的表达水平降低, 而抑制 miRNA-296-5p 的表达水平之后, BOK 的表达水平升高。

2.4 miRNA-296-5p 和 BOK 在胃癌组织和癌旁组织中的表达水平见图 3

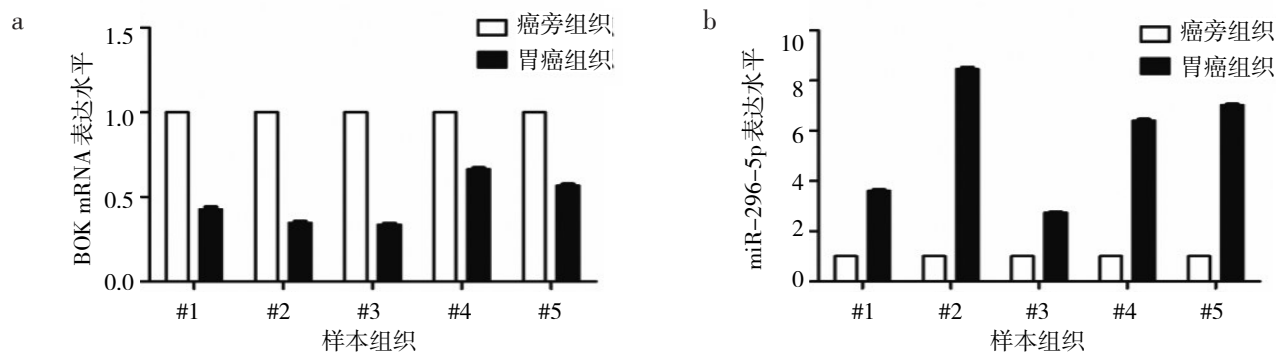


图3 miRNA-296-5p 和 BOK 在胃癌组织和癌旁组织中的表达水平

由图 3 可见, 在 5 对组织样本中, 相比较于癌旁组织, BOK 在胃癌组织中明显降低, 而 miRNA-296-5p 的表达水平正好相反, 在正常组织中表达水平明显降低, 而在胃癌组织中明显升高。

### 3 讨论

在中国, 确诊胃癌时大部分已经是中晚期, 尽管近年来手术以及术后放疗化疗以及靶向药物不断进展, 但是其 5 年生存率仍然在 30%~40%<sup>[7]</sup>。胃癌的进展包含了多条信号通路的失调, 其中凋亡水平的改变是一个重要的方面。在最近的研究中发现, Avicularin 通过 BAK 和 BOK 逆转了胃癌多耐药<sup>[8]</sup>。本次研究旨在研究 BOK 对于胃癌细胞凋亡的影响以及其调节因素。

BOK 属于 Bcl-2 家族, 是执行线粒体途径凋亡的重要因子<sup>[9]</sup>。根据之前的研究结果显示, BAX 和 BAK 对于线粒体孔道的形成具有关键作用, 而 BOK 不具有独立执行线粒体凋亡的功能。本次研究发现 BOK 在肿瘤组织中的表达水平明显低于癌旁组织, 提示了可能的肿瘤抑制功能, 而且这种功能可能和胃癌细胞的凋亡相关。miRNAs 是重要的短链非编码 RNA, 通常在肿瘤形成过程中出现表达异常。其功能类似于转录因子, 通过与 mRNA 结合并降解结合的 mRNA, 从而参与了肿瘤的发生发展过程<sup>[10]</sup>。多个研究显示, miRNAs 参与了胃癌的增殖、凋亡、转移和耐药<sup>[11-13]</sup>。其中, miRNA-296-5p 在一些其他的恶性肿瘤中表现为致瘤因子。在食管癌中, 高表达的 miRNA-296-5p 代表着

较差的预后, 而在体内和体外的实验证实降低 miRNA-296-5p 的表达水平能够抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[14]</sup>。Li 等<sup>[15]</sup>研究显示 miRNA-296-5p 能够通过抑制 CDX1 蛋白的表达, 从而促进胃癌细胞的增殖, 但是其在胃癌细胞的凋亡中的机制仍然未知。本次研究通过检测胃癌细胞的 BOK 蛋白水平和 miRNA-296-5p 水平的关系, 并进一步通过双荧光素酶实验验证了 miRNA-296-5p 通过结合 BOK 的 3' 非编码区来降解 BOK 的 mRNA, 从而降低胃癌细胞中 BOK 的蛋白表达水平。另外本次研究结果显示, miRNA-296-5p 在肿瘤组织中高表达, 在癌旁组织中低表达。因此, 本次研究认为在胃癌细胞中 miRNA-296-5p 靶向 BOK 蛋白, 并且通过 BOK 参与了细胞凋亡。

综上所述, 本研究发现 miRNA-296-5p 在胃癌组织中高表达, 并且在细胞水平证实高表达的 miRNA-296-5p 抑制胃癌细胞凋亡, 其作用可能是通过 BOK 而实现的。

### 参考文献

- 1 Cristescu R, Lee J, Nebozhyn M, et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes[J]. Nat Med, 2015, 21(5): 449-456.
- 2 Jia YJ, Liu ZB, Wang WG, et al. HDAC6 regulates miRNA-27b that suppresses proliferation, promotes apoptosis and target MET in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Leukemia, 2018, 32(3): 703-711.

(下转第 120 页)



- tance and cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23 (25) : 3685-3666.
- 9 Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(6):321-333.
- 10 Nakayama I, Shibasaki M, Yashima-Abo A, et al. Loss of HOXD10 expression induced by upregulation of miR-10b accelerates the migration and invasion activities of ovarian cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(1): 63-71.
- 11 赵欣, 尤胜义. miRNA 在胰腺癌发生、发展及临床应用中的研究进展[J]. *山东医药*, 2015, 55(24): 101-103.
- 12 Sun K, Duan X, Cai H, et al. Curcumin inhibits LPA-induced invasion by attenuating RhoA/ROCK/MMPs pathway in MCF7 breast cancer cells[J]. *Clin Exp Med*, 2016, 16(1):37-47.
- 13 Jiang L, Wen J, Luo W. Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632, inhibits the invasion and proliferation of T24 and 5367 bladder cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (5):7526-7530.
- 14 Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(12):849-864.

(收稿日期 2019-07-20)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第116页)

- 3 Dong XQ, Zhang YH, Shang XQ, et al. Effects of miR-101 on the proliferation and apoptosis of gastric mucosal epithelial cells via Nrf2/ARE signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(12):5187-5194.
- 4 Wang L, Bo X, Zheng Q, et al. miR-296 inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting FGFR1 in human hepatocellular carcinoma[J]. *FEBS Lett*, 2016, 590 (23):4252-4262.
- 5 Lee KH, Lin FC, Hsu TI, et al. MicroRNA-296-5p (miR-296-5p) functions as a tumor suppressor in prostate cancer by directly targeting Pin1[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(9):2055-2066.
- 6 Wang Y, Chen JQ, Chen ZY. Deregulated miR-296 / S100A4 axis promotes tumor invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition in human ovarian cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(2):260-269.
- 7 Chew-Wun Wu, Chao AHsiung, Su-ShunLo, et al. Nodal dissection for patients with gastric cancer: a randomised controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2006, 7(4):309-315.
- 8 Guo XF, Liu JP, Ma SQ, et al. Avicularin reversed multi-drug-resistance in human gastric cancer through enhancing Bax and BOK expressions[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103:67-74.
- 9 Llambi F, Wang YM, Victor B, et al. BOK is a non-canonical BCL-2 family effector of apoptosis regulated by er-associated degradation[J]. *Cell*, 2016, 165(2):421-433.
- 10 David PB. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2):215-233.
- 11 Xu JF, Wang FR, Wang X, et al. miRNA-543 promotes cell migration and invasion by targeting SPOP in gastric cancer[J]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11:5075-5082.
- 12 Hu XY, Miao JY, Zhang M, et al. miRNA-103a-3p promotes human gastric cancer cell proliferation by targeting and Suppressing ATF7 in vitro[J]. *Mol Cells*, 2018, 41 (5):390-400.
- 13 Zheng LD, Chen YJ, Lin Y, et al. miRNA-584-3p inhibits gastric cancer progression by repressing Yin Yang 1-facilitated MMP-14 expression[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:8967.
- 14 Wang ZZ, Luo YR, Du J, et al. MiR-296-5p inhibits cell invasion and migration of esophageal squamous cell carcinoma by downregulating STAT3 signaling[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(12):5206-5214.
- 15 Li T, Lu YY, Zhao XD, et al. MicroRNA-296-5p increases proliferation in gastric cancer through repression of caudal-related homeobox 1[J]. *Oncogene*, 2014, 33 (6) : 783-793.

(收稿日期 2019-08-13)

(本文编辑 蔡华波)