

# miR-146b-5p 靶向调控 NAIF1 抑制胃癌细胞凋亡

马君 王燕忠 牟一平

**[摘要]** 目的 分析 miR-146b-5p 对胃癌细胞 MGC803 增殖与凋亡的调控作用及分子机制。方法 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测不同胃癌细胞系 (MGC803、BGC823、MKN28、MKN45 和 SGC7901) 中 miR-146b-5p 水平; 应用 miR-146b-5p 抑制剂 (inhibitor) 和阴性对照 (miRNA-NC) 分别转染胃癌细胞 MGC803, MTT 法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡比例; TargetScan 数据库分析 miR-146b-5p 的潜在靶基因, 蛋白免疫印迹技术 (western blot) 检测核诱导凋亡因子 1 (NAIF1) 蛋白表达水平; 双荧光素酶实验验证 miR-146b-5p 和 NAIF1 之间的关系。结果 不同胃癌细胞系 (MGC803、BGC823、SGC7901、MKN45 和 MKN28) miR-146b-5p 水平均高于正常人胃黏膜细胞 (GES-1) ( $t$  分别=26.21、13.08、11.09、11.09、6.41,  $P$  均 $<0.05$ )。miR-146b-5p inhibitor 转染胃癌细胞 MGC803 后 miR-146b-5p 水平明显降低 ( $t=9.14$ ,  $P<0.05$ )。抑制 MGC803 胃癌细胞 miR-146b-5p 水平后, 细胞活力明显降低, 细胞凋亡比例升高 ( $t$  分别=3.73、9.55,  $P$  均 $<0.05$ )。miR-146b-5p mimics 转染组 WT-NAIF1 荧光素酶活性明显低于 miRNA-NC 组 ( $t=8.35$ ,  $P<0.05$ )。Western blot 结果表明, 上调 miR-146b-5p 水平后, NAIF1 蛋白表达明显降低 ( $t=5.67$ ,  $P<0.05$ ), 而下调 miR-146b-5p 水平后, NAIF1 蛋白表达明显升高 ( $t=4.32$ ,  $P<0.05$ ), 在过表达 NAIF1 的基础上转染 miR-146b-5p, 细胞活力明显升高, 细胞凋亡比例降低 ( $t$  分别=6.54、4.73,  $P$  均 $<0.05$ )。结论 miR-146b-5p 通过靶向抑制 NAIF1 抑制胃癌细胞凋亡。

**[关键词]** 胃癌; miR-146b-5p; 核诱导凋亡因子 1; 凋亡

**MiR-146b-5p inhibits cells apoptosis by targeting NAIF1 in gastric cancer** MA Jun, WANG Yanzhong, MOU Yiping. Department of Gastrointestinal and Pancreatic Surgery, Zhejiang Provincial People's Hospital, People's Hospital of Hangzhou Medical College, Key Laboratory of Gastroenterology of Zhejiang Province, Hangzhou 310014, China.

**[Abstract]** **Objective** To investigate the regulatory effect and molecular mechanism of miR-146b-5p on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cell MGC803. **Methods** The expressions of miR-146b-5p in different gastric cancer cells were measured by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). MGC803 cells were transfected with miR-146b-5p inhibitor or miRNA-NC respectively. The proliferation of MGC803 cells was measured by MTT, and the apoptosis of MGC803 cells was measured by flow cytometry. The potential targeting genes of miR-146b-5p were analyzed through TargetScan database. The expression of NAIF1 was measured by western blot. The relationship between miR-146b-5p and NAIF1 was discovered. **Results** The expression levels of miR-146b-5p in different gastric cancer cells were higher than that in GES-1 cells ( $t=26.21, 13.08, 11.09, 11.09, 6.41, P<0.05$ ). The expression level of miR-146b-5p in MGC803 was significantly lower after transferring miR-146b-5p inhibitor ( $t=9.14, P<0.05$ ). The proliferation of MGC803 cells with miR-146b-5p inhibitor was remarkably weakened, the apoptosis rate was increased ( $t=3.73, 9.55, P<0.05$ ). Moreover, miR-146b-5p mimics significantly reduced the luciferase activity of WT-NAIF1 ( $t=8.35, P<0.05$ ). The results suggested that miR-146b-5p mimics significantly down-regulated the expression of NAIF1 in MGC803 cells, while miR-146b-5p inhibitor up-regulated the expression of NAIF1 ( $t=5.67, 4.32, P<0.05$ ). Transfection of miR-146b-5p on the basis of overexpression of NAIF1 significantly increased the proliferation and decreased the apoptosis rate ( $t=6.54, 4.73, P<0.05$ ). **Conclusion** MiR-

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.009.006

基金项目: 浙江省教育厅一般科研项目 (Y201942728)

作者单位: 310014 浙江杭州, 浙江省人民医院胃肠胰外科、杭州医学院附属人民医院、浙江省胃肠病学重点实验室 (马君、牟一平); 浙江大学医学院附属邵逸夫医院检验科 (王燕忠)

通讯作者: 牟一平, Email: yipingmou@126.com

146b-5p inhibit the cells apoptosis of gastric cancer through targeting NAIF1.

**[Key words]** gastric cancer; miR-146b-5p; nuclear apoptosis-inducing factor 1; apoptosis

胃癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率均高,严重威胁人类健康<sup>[1]</sup>。早期诊断和手术切除等临床治疗手段在一定程度上延长了胃癌患者生存期,但胃癌死亡率仍然较高,并且在临床诊疗中,血清肿瘤标志物特异性不佳<sup>[2]</sup>。因此,寻找胃癌特异性标志物并研究其作用机制是目前胃癌研究的重点。

miRNA 是一类转录长度为 18~22 个核苷酸的非编码 RNA,通过与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合抑制或者降解靶基因的 mRNA,在胃癌发展进程中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。miR-146b-5p 水平在胃癌、乳腺癌和膀胱癌等多种癌症组织中存在异常<sup>[4,6]</sup>。miR-146b-5p 在体外抑制卷曲螺旋结构域 6 表达促进甲状腺乳头状癌细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[7]</sup>。胃癌患者癌组织 miR-146b-5p 水平升高,与胃癌 TNM 分期相关<sup>[8]</sup>。但 miR-146b-5p 在胃癌细胞中的作用及作用机制目前尚不明确。因此,本次研究拟观察 miR-146b-5p 对胃癌细胞增殖与凋亡的影响,并对其作用的分子机制进行探讨。

## 1 材料与与方法

**1.1 细胞培养** 本次研究在浙江省人民医院和浙江大学医学院附属邵逸夫医院进行,时间为 2019 年 1 月至 2019 年 12 月。胃癌细胞系 (MGC803、BGC823、MKN28、MKN45 和 SGC7901) 和人胃黏膜细胞 (gastric mucosal epithelial ceus-1, GES-1) 均购自中科院上海细胞研究所。胃癌细胞株 MGC803 用含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基培养,放置在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中。Trizol 试剂由 Invitrogen 公司生产,miR-146b-5p 上下游引物、内参 U6、miR-146b-5p mimics、miR-146b-5p inhibitor、lip 2 000 试剂盒和 MTT 细胞增殖检测试剂盒均由 Invitrogen 公司生产,流式凋亡试剂盒由上海碧云天公司生产。

**1.2 细胞转染** 利用 TargetScan 生物学软件分析 miR-146b-5p 潜在靶基因,选取核诱导凋亡因子 1 (nuclear apoptosis-inducing factor 1, NAIF1) 为目标靶基因。2 μmol/L miR-146b-5p mimics (由 Invitrogen 公司生产) 或者 miR-146b-5p inhibitor (由 Invitrogen 公司生产)、阴性对照 miRNA-NC (由 Invitrogen 公司生产) 和 5 μl lip2 000 (由 Invitrogen 公司生产) 分别

加入 OPTI-MEM 稀释至 250 μl,混合静置 15 min 后转染胃癌细胞株。转染 6 h 后换含 10% 胎牛血清,1% 双抗的 DMEM 培养基继续培养。

**1.3 RNA 提取和实时荧光定量 PCR** 当培养的细胞长到 70% 至 80% 融合度时,Trizol (由 Invitrogen 公司生产) 提取 RNA,Primescript RT 获得 cDNA,采用相对定量的比较 Ct 法,即 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法检测 miR-146b-5p 和 NAIF1 水平,以 U6 和 GAPDH 的表达作为内参。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 实验引物序列

名称	序列
miR-146b-5p	Forward : 5'-CCTGGCACTGAGAAGTGAAT-3' Reverse : 5'-GCACCAGAACTGAGTCCACA-3'
NAIF1	Forward : 5'-GGCCCAATGGAATCAGCTACAG-3' Reverse : 5'-GAAGAACTGCTTGATTCTTCG-3'
U6	Forward : 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATA-3' Reverse : 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATA-3'
GAPDH	Forward : 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3' Reverse : 5'-GGCTGTGTCTACTTCTCATGG-3'

**1.4 MTT 检测细胞活力** 在 96 孔板中接种 1×10<sup>4</sup> MGC803 胃癌细胞孵育 24 h 后,采用磷酸盐缓冲液清洗 3 次,每孔加入 500 μg/ml MTT 孵育 3 h,检测吸光度值,计算细胞活力。

**1.5 细胞凋亡检测** 收集 3×10<sup>4</sup> 个细胞,预冷的 70% 乙醇 4℃ 固定 2 h。离心弃去固定液,3 ml 磷酸盐缓冲液重悬后清洗 3 次。1 ml PI 染液染色 4℃ 避光 30 min。AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒由上海碧云天公司生产,统计细胞凋亡比例。

**1.6 双荧光素酶实验** 合成 NAIF1 野生型和突变型报告质粒 (WT-NAIF1 和 MT-NAIF1),分别与 miRNA-NC 或 miR-146b-5p mimics 共转染 MGC803 胃癌细胞 48 h 后荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶活性。

**1.7 Western blot 实验** 细胞裂解液裂解细胞,BCA 测定蛋白含量,每孔加入 40 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转移到 PVDF 膜,5% 的脱脂牛奶室温下封闭 1.5 h, TBST 洗脱 3 次,每次 10 min,用 NAIF1 抗体孵育过夜,二抗 1:5 000 稀释室温下孵育

2 h。内参选用GAPDH。

1.8 统计学方法 采用SPSS 19.0统计学软件分析数据。计量资料数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用t检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同胃癌细胞系和GES-1细胞中miR-146b-5p水平比较见图1

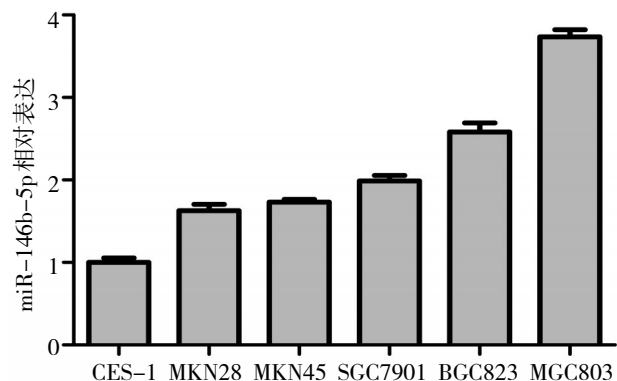


图1 不同胃癌细胞系和GES-1细胞中miR-146b-5p水平

由图1可见,不同胃癌细胞系(MGC803、BGC823、SGC7901、MKN45和MKN28)miR-146b-5p水平均高于正常人胃黏膜细胞GES-1( $t$ 分别=26.21、13.08、11.09、11.09、6.41, $P$ 均 $<0.05$ )。

2.2 miR-146b-5p inhibitor 下调胃癌细胞 MGC803 miR-146b-5p 水平见图2

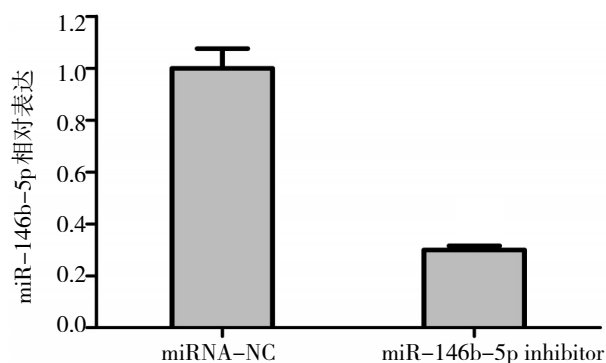


图2 miR-146b-5p inhibitor 下调胃癌细胞 MGC803 miR-146b-5p 水平

由图2可见,miR-146b-5p inhibitor 转染组 miR-146b-5p 水平低于 miRNA-NC 转染组( $t=9.14$ , $P<0.05$ )。

2.3 miR-146b-5p inhibitor 下调胃癌细胞 MGC803 活力见图3

由图3可见,miR-146b-5p inhibitor 转染组细胞活力低于 miRNA-NC 转染组,差异有统计学意义

( $t=3.73$ , $P<0.05$ )。

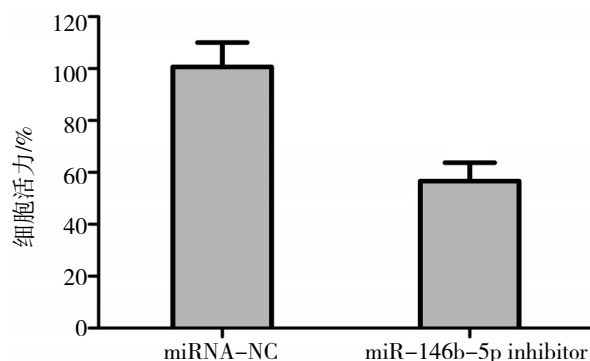


图3 miR-146b-5p inhibitor 下调胃癌细胞 MGC803 活力

2.4 miR-146b-5p inhibitor 升高胃癌细胞 MGC803 凋亡比例见图4

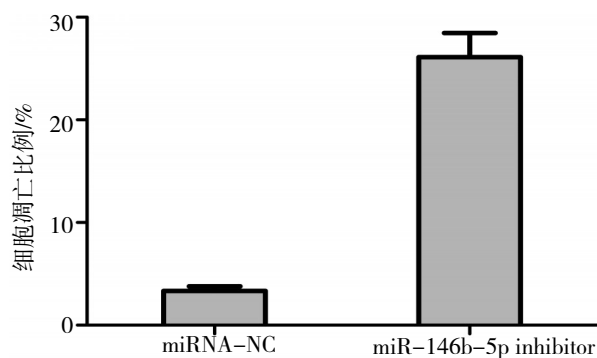


图4 miR-146b-5p inhibitor 升高胃癌细胞 MGC803 凋亡比例

由图4可见,miR-146b-5p inhibitor 转染组细胞凋亡比例高于 miRNA-NC 转染组,差异有统计学意义( $t=9.55$ , $P<0.05$ )。

2.5 miR-146b-5p 与 NAIF1 mRNA 3' UTR 存在互补序列见图5



图5 miR-146b-5p 与 NAIF1 mRNA 3' UTR 互补序列分析

由图5可见,TargetScan 数据库预测发现 miR-146b-5p 与 NAIF1 mRNA 3' UTR 存在互补序列。

2.6 miR-146b-5p mimics 降低 WT-NAIF1 荧光素酶活性见图6

由图6可见,miR-146b-5p mimics 转染组 WT-NAIF1 荧光素酶活性明显低于 miRNA-NC 组,差异有统计学意义( $t=8.35$ , $P<0.05$ )。miR-146b-5p mimics 转染组 MT-NAIF1 荧光素酶活性与 miRNA-NC 组比较,差异无统计学意义( $t=0.00$ , $P>0.05$ )。

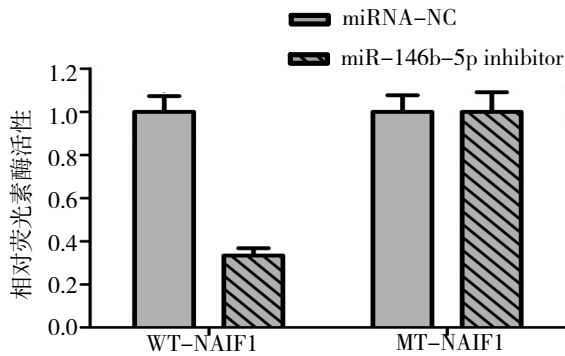


图6 双荧光素酶报告实验检测miR-146b-5p与NAIF1的结合作用

2.7 miR-146b-5p inhibitor促进NAIF1蛋白表达见图7

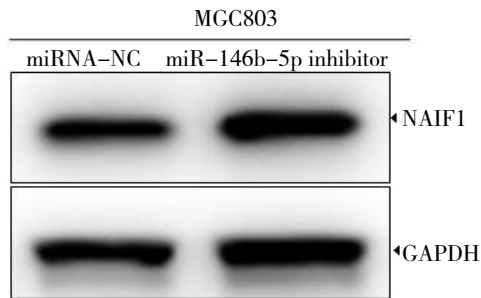


图7 miR-146b-5p inhibitor促进NAIF1蛋白表达

由图7可见,miR-146b-5p inhibitor转染组NAIF1蛋白表达高于miRNA-NC组,差异有统计学意义( $t=4.32, P<0.05$ )。

2.8 miR-146b-5p mimics抑制NAIF1蛋白表达见图8

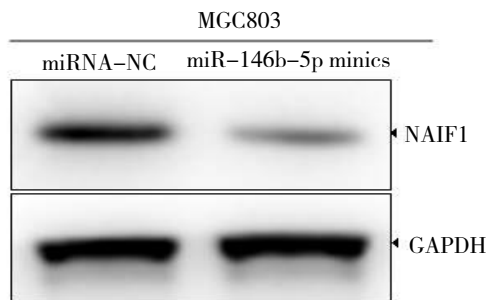


图8 miR-146b-5p mimics抑制NAIF1蛋白表达

由图8可见,miR-146b-5p mimics转染组NAIF1蛋白表达低于miRNA-NC组,差异有统计学意义( $t=5.67, P<0.05$ )。

2.9 NAIF1过表达质粒促进NAIF1蛋白表达见图9

由图9可见,NAIF1过表达质粒转染组NAIF1蛋白表达高于Vector转染组,差异有统计学意义( $t=9.26, P<0.05$ )。

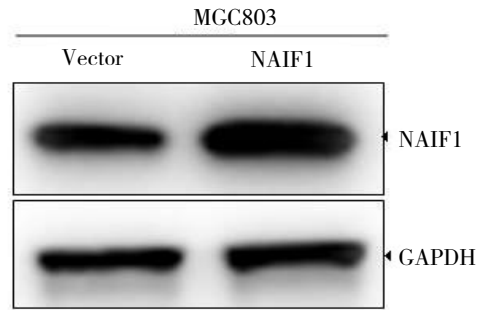


图9 NAIF1过表达质粒促进NAIF1蛋白表达

2.10 miR-146b-5p靶向NAIF1促进胃癌细胞增殖见图10

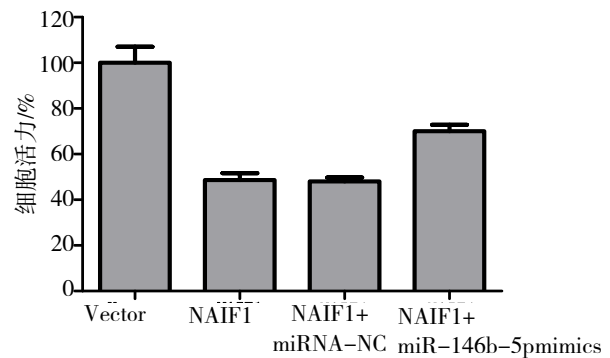


图10 miR-146b-5p靶向NAIF1促进胃癌细胞增殖

由图10可见,NAIF1过表达质粒转染组细胞活力低于Vector组,差异有统计学意义( $t=6.68, P<0.05$ ),NAIF1过表达质粒+miR-146b-5p mimics共转染组细胞活力明显高于NAIF1过表达质粒+miRNA-NC组,差异有统计学意义( $t=6.54, P<0.05$ )。

2.11 miR-146b-5p靶向NAIF1抑制胃癌细胞凋亡见图11

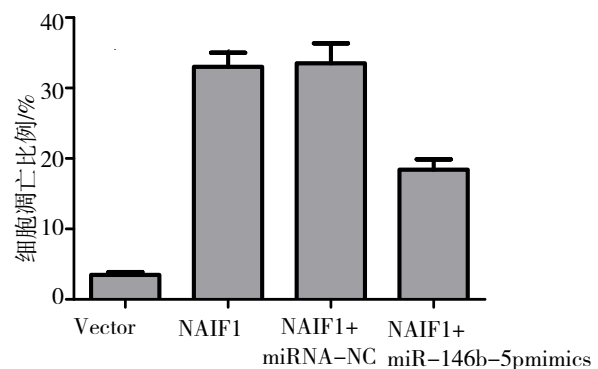


图11 miR-146b-5p靶向NAIF1抑制胃癌细胞凋亡

由图11可见,NAIF1过表达质粒转染组细胞凋亡比例高于Vector组( $t=14.37, P<0.05$ ),NAIF1过表达质粒+miR-146b-5p mimics共转染组细胞凋亡比例低于NAIF1过表达质粒+miRNA-NC组,差异有统计学意义( $t=4.73, P<0.05$ )。

### 3 讨论

由于胃癌早期缺乏有效的生物标记物,被发现时已是中晚期,预后较差<sup>[9]</sup>。细胞无限增殖和低凋亡率是胃癌发展的重要因素<sup>[10]</sup>。既往研究表明,miRNA已广泛用于胃癌研究,例如miRNA-296-5p靶向BOX抑制胃癌细胞的凋亡<sup>[11]</sup>。miR-10b、miR-21、miR-223、miR-338、let-7a、miR-30a-5p、miR-126等7个miRNA与胃癌患者的无复发生存率和总体生存率密切相关,可作为胃癌患者预后的重要指标<sup>[12]</sup>。

最近研究发现miR-146b-5p与胃癌进展密切相关,miR-146b-5p水平升高导致胃癌患者存活率较低<sup>[8]</sup>。然而,miR-146b-5p调控的分子机制仍不清楚。本次研究发现miR-146b-5p通过下调NAIF1表达来促进胃癌细胞增殖,抑制细胞凋亡。同时,本次研究检测不同胃癌细胞系miR-146b-5p水平,在胃癌细胞MGC803中miR-146b-5p水平明显升高;下调胃癌细胞MGC803中miR-146b-5p水平,细胞活力降低,凋亡比例升高。除了胃癌外,miR-146b-5p通过与抑癌基因TRAF6的3'UTR结合促进肾癌细胞增殖,miR-146b-5p的上调导致肾癌的不良预后<sup>[13]</sup>。

NAIF1是诱导细胞凋亡的重要因子,在胃癌组织中被下调,过表达NAIF1诱导胃癌细胞凋亡<sup>[14]</sup>。同样地,本次研究发现在胃癌细胞MGC803中过表达NAIF1,细胞活力下降,凋亡比例升高。已有研究表明miR-24通过与NAIF1的3'UTR结合,促进非小细胞肺癌细胞增殖<sup>[15]</sup>。miR-128靶向NAIF1促进骨肉瘤细胞增殖和迁移<sup>[16]</sup>。本次研究通过生物信息学工具预测了miR-146b-5p与NAIF1之间的靶向关系,并通过双荧光素酶报告实验证实miR-146b-5p与NAIF1的3'UTR结合,过表达的miR-146b-5p逆转NAIF1的作用,促进胃癌细胞增殖,抑制细胞凋亡。

综上所述,miR-146b-5p在胃癌细胞中高表达,并且在细胞水平证实高表达的miR-146b-5p促进胃癌细胞增殖,抑制胃癌细胞凋亡,其作用可能是通过NAIF1实现的。

#### 参考文献

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- Li S, Zhang M, Zhang H, et al. Exosomal long noncoding RNA lnc-GNAQ-6:1 may serve as a diagnostic marker for gastric cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 501(10): 252-257.
- Wei L, Sun J, Zhang N, et al. Noncoding RNAs in gastric cancer: implications for drug resistance [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 62-69.
- Xue Y, Tong L, Liu A, et al. Tumor-infiltrating M2 macrophages driven by specific genomic alterations are associated with prognosis in bladder cancer [J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(2): 581-594.
- Li M, Zou X, Xia T, et al. A five-miRNA panel in plasma was identified for breast cancer diagnosis [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(16): 7006-7017.
- Tang S, Cheng J, Yao Y, et al. Combination of four serum exosomal mirnas as novel diagnostic biomarkers for early-stage gastric cancer [J]. *Front Genet*, 2020, 11(1): 237-241.
- Jia M, Shi Y, Li Z, et al. MicroRNA-146b-5p as an oncomiR promotes papillary thyroid carcinoma development by targeting CCDC6 [J]. *Cancer Lett*, 2019, 443(2): 145-156.
- Chen Z, Saad R, Jia P, et al. Gastric adenocarcinoma has a unique microRNA signature not present in esophageal adenocarcinoma [J]. *Cancer*, 2013, 119(11): 1985-1993.
- Peng Y, Zhang X, Ma Q, et al. MiRNA-194 activates the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in gastric cancer by targeting the negative Wnt regulator, SUFU [J]. *Cancer Lett*, 2017, 385(2): 117-127.
- Feng J, Guo J, Wang JP, et al. MiR-129-5p inhibits proliferation of gastric cancer cells through targeted inhibition on HMGB1 expression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(7): 3665-3673.
- 汤国军, 吴俊, 吴章强, 等. miRNA-296-5p 靶向 BOX 抑制胃癌细胞的凋亡 [J]. *全科医学临床与教育*, 2020, 18(2): 113-116, 120.
- Li X, Zhang Y, Zhang Y, et al. Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature [J]. *Gut*, 2010, 59(5): 579-585.
- Meng G, Li G, Yang X, et al. Inhibition of miR146b-5p suppresses CT-guided renal cell carcinoma by targeting TRAF6 [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 23(2): 318-328.
- Yang M, Gu YY, Peng H, et al. NAIF1 inhibits gastric cancer cells migration and invasion via the MAPK pathways [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(6): 1037-1047.
- Zhao G, Liu L, Zhao T, et al. Upregulation of miR-24 promotes cell proliferation by targeting NAIF1 in non-small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(5): 3693-3701.
- Kong D, Zhang Z. NAIF1 suppresses osteosarcoma progression and is regulated by miR-128 [J]. *Cell Biochem Funct*, 2018, 36(8): 443-449.

(收稿日期 2020-08-10)

(本文编辑 蔡华波)