

# 微小RNA191-5p通过靶向CDK6抑制胃癌细胞的生长

曹楠婧<sup>1</sup> 侯会会<sup>1</sup> 李峰<sup>2</sup> 郭素堂<sup>2</sup> 汪毅<sup>3</sup>

<sup>1</sup>山西医科大学生物化学与分子生物学教研室,太原030001;<sup>2</sup>山西省肿瘤医院,太原030013;<sup>3</sup>国家癌症中心 国家肿瘤临床医学研究中心 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院特需医疗部,北京100021

通信作者:郭素堂,Email:sutangguo@aliyun.com;汪毅,Email:2542888307@qq.com

**【摘要】目的** 探讨微小RNA191-5p(miR-191-5p)对胃癌细胞迁移、克隆形成和增殖的影响。**方法** 采用实时定量-聚合酶链反应(Real-time PCR)检测分析了来自山西省肿瘤医院的60例胃癌患者的胃癌组织(C组)及其癌旁正常组织(N组)中miR-191-5p的表达水平;应用pcDNA3.1载体构建过表达miR-191-5p的重组质粒(pcDNA-miR-191-5p),实现miR-191-5p在胃癌细胞中的过表达,用miR-191-5p inhibitor实现miR-191-5p在胃癌细胞中的低表达;分别用划痕愈合实验、克隆形成实验和CCK-8法检测细胞迁移、克隆形成和增殖能力;Targetscan预测miR-191-5p与周期素依赖性激酶6(CDK6)的结合位点,并通过双荧光报告基因验证;Western印迹检测miR-191-5p对p21和CDK6蛋白表达的影响。**结果** 与N组相比,C组中有53例(88%)胃癌组织中出现miR-191-5p的表达下调;C组miR-191-5p的表达水平为 $0.43\pm 0.13$ ,显著低于N组的 $0.88\pm 0.12$ , $P<0.001$ ,过表达miR-191-5p能显著抑制胃癌细胞的迁移、克隆形成和增殖能力,差异有统计学意义( $P<0.05$ );双荧光报告基因证实miR-191-5p与CDK6的3'UTR结合;Western印迹显示胃癌细胞中pcDNA-miR-191-5p下调了CDK6表达而上调了p21表达。**结论** miR-191-5p表达下调可能参与胃癌的发生发展,过表达miR-191-5p能下调CDK6并抑制胃癌细胞生长。

**【关键词】** 胃肿瘤; 微小RNA191-5p; 周期素依赖性激酶6; 迁移; 增殖

**基金项目:**山西省重点研发计划项目(201803D31166);山西省科技厅基础面上项目(201801D121303)

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20200407-01111

## miRNA-191-5p represses cell growth by targeting CDK6 in gastric cancer

Cao Nanjing<sup>1</sup>, Hou Huihui<sup>1</sup>, Li Feng<sup>2</sup>, Guo Sutang<sup>2</sup>, Wang Yi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; <sup>2</sup>Shanxi Cancer Hospital, Taiyuan 030013, China; <sup>3</sup>Department of VIP Medical Services, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Corresponding authors: Guo Sutang, Email: sutangguo@aliyun.com; Wang Yi, Email: 2542888307@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of miR-191-5p on cell migration, clone formation and proliferation of gastric cancer (GC) cells. **Methods** The level of miR-191-5p expression was detected by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in 60 paired GC tissues and their adjacent normal tissues. miR-191-5p overexpression was achieved by transfection of construct pcDNA-miR-191-5p into GC cells. The migration, clone formation and proliferation of GC cells were detected by the scratch wound assay, clone formation assay and cell counting kit-8 (CCK-8), respectively. Low expression of miR-191-5p was achieved with miRNA-191-5p inhibitor. The binding sites of cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) and miR-191-5p were analyzed using TargetScan software, and the interaction of CDK6 and miR-191-5p was verified using dual-fluorescence reporter gene expression. Western blot (WB) was used to detect the effect of miR-191-5p on the expression of p21 and CDK6 proteins. **Results** miR-191-5p decreased in 53 cases (88%) of GC tissues compared to their controls. Furthermore, overexpression of miR-191-5p effectively inhibited the migration, clone formation and proliferation of GC cells ( $P<0.05$ ). Dual-fluorescence reporter confirmed that miR-191-5p bound to 3'UTR of CDK6. WB

showed that pcDNA-miR-191-5p inhibited the CDK6 expression but promoted the p21. **Conclusion** Down-regulation of miR-191-5p has a correlation with the progression of GC. Overexpression of miR-191-5p can decrease the expression of CDK6 and inhibit the growth of GC cells.

**【Key words】** Gastric neoplasm; MicroRNA 191-5p; Cyclin-dependent kinase 6; Migration; Proliferation

**Fund program:** Key Research and Development (R&D) Projects of Shanxi Province (201803D31166); Basic Research Project of Science and Technology Department of Shanxi Province (201801D121303)

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20200407-01111

胃癌(GC)是消化道常见的恶性肿瘤之一,多见于胃窦及前后壁等部位,多数属于腺癌<sup>[1]</sup>。其中男性发病率为女性的 1.5~2 倍<sup>[2]</sup>。在中国由于生活饮食环境等因素的影响,胃癌发病率始终居高不下<sup>[3]</sup>。细胞因子、基因编辑或者肿瘤相关蛋白的异常表达等可能最终影响胃癌的发生发展,但其发生发展机制还缺乏深刻的了解。

微小 RNA(miRNAs)是一类长 20~25 个核苷酸的非编码单链 RNA<sup>[4]</sup>,在转录后水平参与调控靶基因的表达<sup>[5]</sup>,从而影响细胞内多种生物学过程<sup>[6]</sup>。微小 RNA-191-5p(miRNA-191-5p, miR-191-5p)的表达异常可通过调控癌细胞的增殖,抑制相关蛋白表达,最终影响肿瘤的进展<sup>[7]</sup>。随着生物信息的快速发展,越来越多的芯片和测序技术运用到肿瘤研究中,因此科学家已在多种人类肿瘤中筛选出异常表达的 miRNAs<sup>[2,8]</sup>。这些 miRNAs 与不同基因蛋白相互作用,调节细胞功能,参与肿瘤发生发展<sup>[8]</sup>。miRNA-191-5p 在肾脏上皮细胞癌、乳腺癌、肺癌和结肠癌中表达下调<sup>[7,9-11]</sup>,在骨肉瘤中则通过靶向 EGR1 激活 PI3K/AKT 信号通路从而促进肿瘤的发展<sup>[12]</sup>,但在胃癌细胞中的相关研究还未见报道,通过前期生信分析发现 miRNA-191-5p 在胃癌临床样本中表达下调,但如何参与胃癌的功能还未见报道。因此,本研究通过观察 miRNA-191-5p 对胃癌细胞迁移、克隆形成和增殖的影响,以及调控靶基因周期素依赖性激酶 6(CDK6)的表达,为临床胃癌的诊疗提供理论参考。

## 对象与方法

### 一、研究对象

1. 细胞和试剂:胃癌 MGC-803、BGC-823 细胞系(ATCC); miR-NC, miR-inhibitor(北京瑞博泰克生物科技有限公司);引物由上海生工生物工程公司合成;RNA 核酸提取试剂盒(无锡百泰克公司);反转录试剂盒(北京天根公司);LipoFiter™ 转染试

剂(美国 Life Technology 公司);胰蛋白酶(北京索莱宝生物科技有限公司);DMEM 高糖培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司)。

2. 胃癌组织样本:人胃癌组织及其癌旁正常组织来自于山西省肿瘤医院样本组织库(共 60 例)。样本收集是在山西省肿瘤医院和基础医学研究所的伦理审查委员会通过后进行,且获得患者的知情同意。临床标本取出后一部分立即冻存在液氮中保存,一部分用 10% 甲醛固定,用于组织病理学诊断。

### 二、研究方法

1. 细胞培养:用完全培养基(10% 胎牛血清的 DMEM)于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养胃癌 MGC-803、BGC-823 细胞,细胞增殖达 70%~80% 时,用胰蛋白酶进行消化、传代。

2. 实时定量-聚合酶链反应(Real-time PCR)检测 miR-191-5p 水平:用 TRIZOL 法提取细胞总 RNA, M-MLV 逆转录酶合成 cDNA 第一链,再 PCR 扩增,以 U6 snRNA 为定量内参,扩增设置 3 个重复,用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算 mRNA 的相对表达量。miR-191-5p 上游引物:5' ACTGGATACGACCAGCTGCT 3'; miR-191-5p 下游引物:5' TCGCCCAACGGAATCCAAAAGC 3'; U6 snRNA 上游引物:5' CGCT TCGGCAGCACATATAC 3'; U6 snRNA 下游引物:5' AAATATGGAACGCTTCACGA 3'。

3. 胃癌 MGC-803、BGC-823 细胞系的转染:转染前 1 d 用 6 孔板在完全培养基中于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,24~36 h 后细胞增殖达到 60%~70% 时进行转染,转染时将 5 μl 浓度为 20 nmol/L 的 pcDNA-miR-191-5p 以及阴性对照(pcDNA-NC),分别加入 200 μl 无血清培养基中混匀,在分别加入 3~4 μl 转染试剂,静置 5 min 后再混合静置 20 min,将混合物直接加入 6 孔板细胞中,摇匀后再培养 36~48 h 后进行分组。

4. 细胞增殖实验:分别用 pcDNA-miR-191-5p 及对照空载体 pcDNA(pcDNA-NC)转染 MGC-803、

BGC-823 细胞,转染 36~48 h 后,弃去培养基,收集细胞,重悬于新鲜的完全培养基,按照  $1 \times 10^3$  cell/孔种植于 96 孔板,每组 3 个重复,加入  $10 \mu\text{l}$ /孔 CCK-8,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 3 h,酶标仪测定 450~630 nm 吸光度(A)值。

5. 细胞划痕实验:分别用 pcDNA-miR-191-5p 及空载体 pcDNA (pcDNA-NC) 转染 MGC-803、BGC-823 细胞,转染 48 h 后,收集细胞,按照  $7 \times 10^5$  cell/孔种植于 6 孔板。6~10 h 细胞贴壁后,超净台下用  $200 \mu\text{l}$  枪头在细胞表面进行垂直划痕(每隔 0.5~1 cm 均匀划横线,横穿过孔),每组 3 个重复。0、24、和 48 h 后显微镜下观察并拍照。

6. 克隆形成实验:收集转染 pcDNA-miR-191-5p 及空载体 pcDNA (pcDNA-NC) 的 MGC-803、BGC-823 细胞,细胞以 2 000 个/孔的数量接种到 6 孔培养板上。待细胞继续生长 10~12 d 后,用甲醇或 1:3 醋酸/甲醇 5 ml 固定 15 min,去固定液后加入结晶紫(0.5% 溶液)染色 10~30 min,流水缓慢洗去染色液,显微镜下拍照并计数。

7. Western 印迹实验:TRIZOL 法提取蛋白并测定蛋白含量,按每孔  $20 \mu\text{l}$  上样,40 V 电压电泳 2~3 h 后进行转膜;将 PVDF 膜放于 Western 封闭液封闭 60 min 后,室温下在封闭液稀释的一抗中孵育 1~2 h,  $1 \times \text{TBS}$  洗涤 2~3 次,每次 10 min;室温孵育二抗 1~2 h, Tris 缓冲盐液(TBS)洗涤 2~3 次,每次 10 min;将 A 和 B 显影液 1:1 混匀并与膜充分接触, 2~10 min 后通过凝胶图像分析。

8. 双荧光素酶报告:将 miR-191-5p 与 CDK6 质粒载体共转细胞,每组重复 3 次;转染后 36 h 后收集细胞,PBS 清洗 2~3 次,每孔加入  $100\sim 150 \mu\text{l}$  裂解液裂解细胞 20~30 min,将  $10 \mu\text{l}$  细胞裂解液加入 96 孔板中,轻轻吹打 2~3 次混匀,通过酶标仪检测萤火虫和海参荧光素酶活性。

9. 统计学处理:分析使用 SPSS 16.0 统计软件。符合正态分布的计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $t$  检验;不符合正态分布资料比较则采用两样本秩和检验比较。双侧检验,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 结 果

1. miR-191-5p 在胃癌临床样本中表达下调:将 60 对胃癌组织进行 Real-time PCR,结果显示,胃癌组织 miR-191-5p 的表达水平为  $0.43 \pm 0.13$ ,显著低于癌旁正常组织的  $0.88 \pm 0.12$ ,  $P < 0.001$  (图 1)。

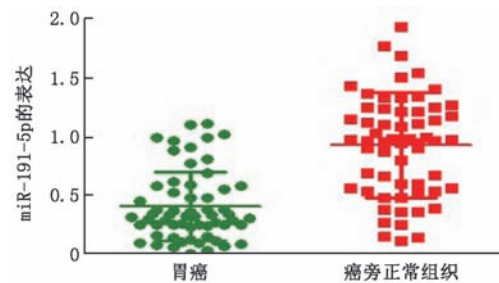
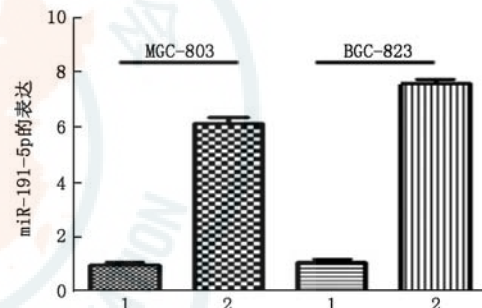


图 1 胃癌组织( $n=60$ )及其癌旁正常组织( $n=60$ )中 miR-191-5p 的相对表达

2. miR-191-5p 过表达能抑制 MGC-803、BGC-823 细胞的迁移和克隆形成: MGC-803、BGC-823 细胞转染 pcDNA-miR-191-5p 和 pcDNA-NC 后,通过 Real-time PCR 检测其表达水平,证明其过表达成功(图 2)。



注:1为 pcDNA-NC;2为 pcDNA-miR-191-5p

图 2 qPCR 分析胃癌细胞 MGC-803 和 BGC-823 中转染 pcDNA-miR-191-5p 或 pcDNA-NC 的表达情况

MGC-803 细胞划痕 24 h 后, pcDNA-miR-191-5p 组划痕愈合率为  $20.0\% \pm 1.8\%$ ,显著低于 pcDNA-NC 组的  $43.0\% \pm 1.6\%$ ,划痕 48 h 后, pcDNA-miR-191-5p 组划痕愈合率为  $33.1\% \pm 1.8\%$ ,明显低于 pcDNA-NC 组的  $60.1\% \pm 2.3\%$ ,  $P < 0.05$  (图 3)。在 BGC-823 细胞中结果相似,划痕 24 h 后, pcDNA-miR-191-5p 组划痕愈合率为  $11.0\% \pm 1.8\%$ ,显著低于 pcDNA-NC 组的  $51.0\% \pm 1.7\%$ ,划痕 48 h 后, pcDNA-miR-191-5p 组划痕愈合率为  $24.2\% \pm 1.6\%$ ,明显低于 pcDNA-NC 组的  $64.0\% \pm 2.3\%$ ,  $P < 0.05$  (图 3)。

MGC-803 细胞经固定后, pcDNA-miR-191-5p 组细胞集落形成率为  $387.2\% \pm 6.8\%$ ,明显低于 pcDNA-NC 组的  $547.3\% \pm 10.3\%$ ,  $P < 0.05$  (图 4)。BGC-823 细胞经固定后, pcDNA-miR-191-5p 组细胞集落形成率为  $399.5\% \pm 8.4\%$ ,明显低于 pcDNA-NC 组的  $512.1\% \pm 9.3\%$ ,  $P < 0.05$  (图 4)。



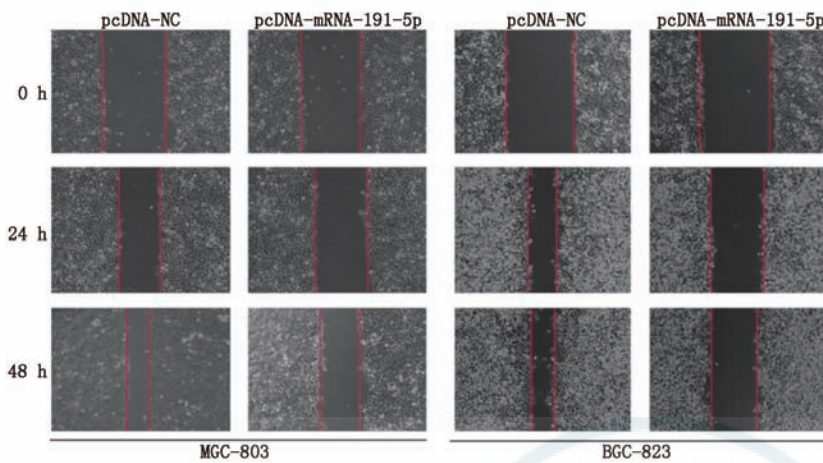


图3 划痕实验检测 pcDNA-miR-191-5p、pcDNA-NC 处理后胃癌细胞 MGC-803、BGC-823 细胞迁移能力(×50)

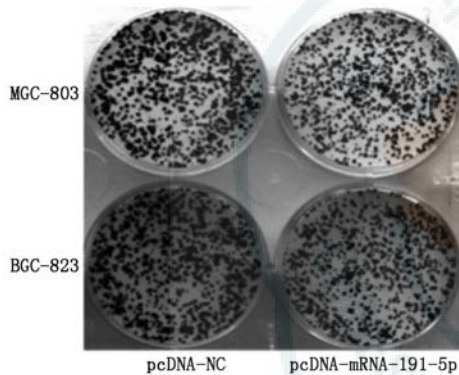


图4 克隆形成实验检测 pcDNA-NC、pcDNA-miR-191-5p 处理后胃癌细胞 MGC-803、BGC-823 细胞集落形成率(×50)

3. miR-191-5p 过表达能显著抑制 MGC-803、BGC-823 细胞的增殖能力:在 MGC-803、BGC-823 细胞中转染 pcDNA-miR-191-5p 后,在 0、24、48、72 和 96 h, pcDNA-miR-191-5p 组对胃癌 MGC-803、BGC-823 细胞增殖能力都有显著抑制(图5)。

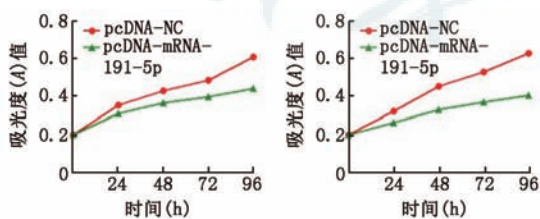
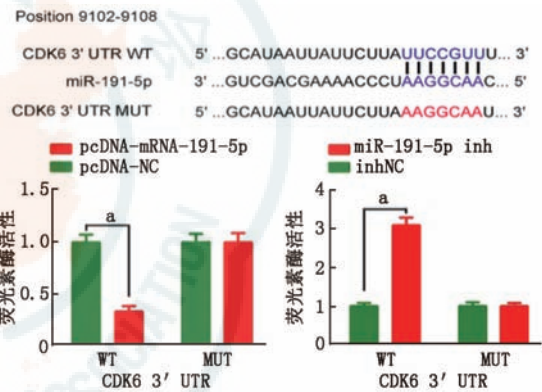


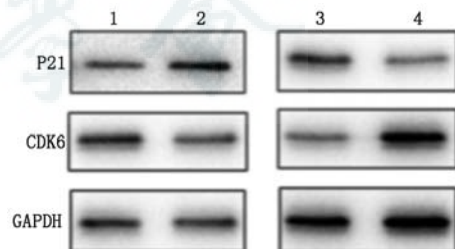
图5 CCK-8 检测 pcDNA-miR-191-5p、pcDNA-NC 处理后胃癌细胞 MGC-803(左图)及 BGC-823(右图)细胞增殖能力

4. miR-191-5p 靶向结合 CDK6:Targetscan 预测到 miR-191-5p 能靶向结合 CDK6,通过双荧光素酶报告基因实验证实,miR-191-5p 能与 CDK6 的 3' UTR 结合,并影响荧光素酶的活性(图6)。



注: WT 为在 CDK6 中 miR-191-5p 预测的结合位点; MUT 为突变体

图6 荧光素酶报告基因实验检测 miR-191-5p 过表达或抑制剂对 CDK6 野生型或突变型荧光素酶活性的影响。\*代表 pcDNA-miR-191-5p 与 pcDNA-NC 或 miR-191-5p inh 与 inhNC, P<0.01



注: 1 为 pcDNA-NC; 2 为 pcDNA-miR-191-5p; 3 为 inhNC; 4 为 miR-191-5p 抑制剂

图7 Western 印迹检测胃癌细胞中 miR-191-5p 对 p21 和 CDK6 蛋白表达的影响

miRNA 与人类癌症的发病机制有关,参与调控不同生物学过程。例如,miR-129 被发现通过靶向 CDK4, CDK6 和 MDM2 抑制神经胶质瘤细胞生长<sup>[13]</sup>。miR-338-3p 通过诱导失活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信

5. miR-191-5 抑制 CDK6 表达: Western 印迹检测过表达或敲低 miR-191-5p 后 CDK6 的表达情况,结果显示,与 pcDNA-NC 相比, pcDNA-miR-191-5p 下调了 CDK6 表达而上调了 p21,而与 inh NC 相比, miR-191-5p inhibitor 则上调 CDK6 表达而下调 p21 表达(图7)。

### 讨 论

近年来,越来越多的研究发现

号通路抑制 SOX5 表达,从而抑制胃癌细胞的增殖和转移<sup>[14]</sup>。本研究通过 Real-time PCR 分析了 60 例胃癌细胞 miR-191-5p 的表达,发现与癌旁正常组织相比,在 53 例癌组织中 miR-191-5p 的表达水平明显下调。miR-191 位于人类 3 号染色体 DALRD3 基因的第三个内含子(3p21.31)。先前的研究表明,miR-191-5p 在肾脏上皮细胞癌、乳腺癌、肺癌和结肠癌中表达下调<sup>[7, 9-11]</sup>,与本课题的结果一致,但在骨肉瘤中则通过靶向 EGR1 激活 PI3K/AKT 信号通路促进肿瘤的发展<sup>[12]</sup>。本研究通过对胃癌 MGC-803、BGC-823 细胞的转染及进一步功能实验发现,过表达 miR-191-5p 能显著抑制 CDK6 的表达,从而抑制肿瘤细胞的迁移、克隆形成和增殖能力。双荧光报告基因表明 miR-191-5p 能直接靶向 CDK6 的 3' UTR 区,但是否还有其他基因参与调控,我们需要进一步实验确定。

尽管 miRNAs 的表达谱存在差异,但对于 miR-191-5p 在不同肿瘤中大部分都表现出相同的表达趋势,这说明 miR-191-5p 在肿瘤形成过程中具有一定调控作用。本实验结果表明 miR-191-5p 在 88% 的胃癌患者中表达下调,并通过抑制 CDK6 的表达抑制肿瘤细胞。但我们选择的 60 例胃癌患者作为研究对象,前期是否经过放化疗,以及肿瘤的进展程度是否有差异,我们还需要进一步整理确定。本文通过研究 miR-191-5p 的作用机制,或许能为胃癌的临床治疗或预后标记提供新的参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] Sha M, Ye J, Luan ZY, et al. Celestrol induces cell cycle arrest by MicroRNA-21-mTOR-mediated inhibition p27 protein degradation in gastric cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2015, 15:101. DOI: 10.1186/s12935-015-0256-3.
- [2] Rao M, Zhu Y, Zhou Y, et al. MicroRNA-122 inhibits proliferation and invasion in gastric cancer by targeting CREB1[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(2):323-333.
- [3] Bray F, Jemal A, Grey N, et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(8): 790-801. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70211-5.
- [4] Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA[J]. *Science*, 2001, 293(5531):834-838. DOI: 10.1126/science.1062961.
- [5] Kim YK, Yu J, Han TS, et al. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(5):1672-1681. DOI: 10.1093/nar/gkp002.
- [6] Tili E, Michaille JJ, Calin GA. Expression and function of micro-RNAs in immune cells during normal or disease state [J]. *Int J Med Sci*, 2008, 5(2): 73-79.
- [7] Chen P, Pan X, Zhao L, et al. MicroRNA-191-5p exerts a tumor suppressive role in renal cell carcinoma[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2):1686-1693. DOI: 10.3892/etm.2017.5581.
- [8] Deng S, Calin GA, Croce CM, et al. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(17): 2643-2646. DOI: 10.4161/cc.7.17.6597.
- [9] Chen XY, Zhang J, Hou LD, et al. Upregulation of PD-L1 predicts poor prognosis and is associated with miR-191-5p dysregulation in colon adenocarcinoma[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2018, 32: 2058738418790318. DOI: 10.1177 / 2058738418790318.
- [10] Sharma S, Nagpal N, Ghosh PC, et al. P53-miR-191-SOX4 regulatory loop affects apoptosis in breast cancer[J]. *RNA*, 2017, 23(8):1237-1246. DOI: 10.1261/rna.060657.117.
- [11] Zhou LY, Zhang FW, Tong J, et al. MiR-191-5p inhibits lung adenocarcinoma by repressing SATB1 to inhibit Wnt pathway [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2020, 8(1):e1043. DOI: 10.1002/mgg3.1043.
- [12] Chen B, Zheng ZY, Yang JZ, et al. MicroRNA-191-5p promotes the development of osteosarcoma via targeting EGR1 and activating the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(9):3611-3620. DOI: 10.26355/eurrev\_201905\_17783.
- [13] Moradimotlagh A, Arefian E, Rezazadeh Valojerdi R, et al. MicroRNA-129 inhibits glioma cell growth by targeting CDK4, CDK6, and MDM2[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 759-764. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.11.033.
- [14] Zheng JJ, Que QY, Xu HT, et al. Hypoxia activates SOX5/wnt/ $\beta$ -catenin signaling by suppressing mir-338-3p in gastric cancer[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 1533033820905825. DOI: 10.1177/1533033820905825.

(收稿日期:2020-04-07)

(本文编辑:陈新石)