

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.08.009

· 临床研究 ·

胃癌组织中高表达的 miR-504 通过 TP53INP1 调控胃癌细胞 BGC-823 的生物学行为

刘真义, 翁国武, 关李稳, 周真真, 王力雅, 冯红军 (海南省第三人民医院暨 三亚中心医院 消化内科, 海南 三亚 572000)

[摘要] **目的:** 探究微小 RNA-504 (miRNA-504) 在胃癌 (GC) 组织中的表达水平及其对 GC 细胞生物学行为的调控机制。**方法:** 收集 2020 年 6 月至 2020 年 12 月期间三亚中心医院外科收治的 48 例胃癌患者的肿瘤组织及癌旁组织标本, qPCR 检测组织中 miR-504、肿瘤蛋白 53 诱导型核蛋白 1 (tumor protein 53-induced nuclear protein 1, TP53INP1) mRNA 的水平, WB 法检测 TP53INP1 水平。体外培养人胃癌细胞 BGC-823, 分为对照组 (正常培养的 BGC-823 细胞)、miR-504 mimic 组、mimic-NC 组、miR-504 inhibitor 组、inhibitor-NC 组、miR-504 inhibitor+si-NC 组、miR-504 inhibitor+si-TP53INP1 组, qPCR 检测细胞中 miR-504 和 TP53INP1 mRNA 的表达, MTT 法、流式细胞术、划痕实验和 Transwell 侵袭实验分别检测各组细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭能力, WB 法检测各组细胞中增殖、迁移和侵袭相关蛋白 (Cyclin D1、E-cadherin、MMP-2、MMP-9) 以及 TP53INP1 的表达。双荧光素酶报告基因实验进一步验证 miR-504 与 TP53INP1 mRNA 的靶向关系。**结果:** 与癌旁组织相比, 胃癌组织中 miR-504 的表达显著升高 ($P < 0.05$), 而 TP53INP1 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), miR-504 和 TP53INP1 mRNA 两者的表达呈负相关 ($P < 0.01$)。与对照组相比, miR-504 mimic 组 BGC-823 细胞中 miR-504 的表达显著升高 ($P < 0.05$)、TP53INP1 mRNA 和蛋白的表达显著降低 (均 $P < 0.05$), 且细胞增殖率、划痕愈合率、侵袭入 Transwell 小室下层的细胞数量, Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达均显著增加, 细胞凋亡率和 E-cadherin 蛋白表达均显著降低 (均 $P < 0.05$)。转染 miR-504 inhibitor 能显著下调 BGC-823 中 miR-504 的表达、上调 TP53INP1 mRNA 和蛋白的表达, 抑制细胞的增殖、迁移与侵袭能力而促进细胞凋亡 (均 $P < 0.05$); 而下调 TP53INP1 的表达可明显减弱 miR-504 下调对 BGC-823 细胞增殖、迁移与侵袭的抑制作用 ($P < 0.01$)。miR-504 高表达能明显抑制野生型 TP53INP1 质粒的荧光素酶活性 ($P < 0.05$)。**结论:** miR-504 在胃癌组织中呈高表达, 下调 miR-504 可抑制胃癌 BGC-823 细胞的恶性生物学行为而促进其凋亡, 其作用机制可能与靶向调控 TP53INP1 的表达有关。

[关键词] 胃癌; BGC-823 细胞; miRNA-504; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭; 肿瘤蛋白 53 诱导型核蛋白 1

[中图分类号] R735.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)08-0824-09

Highly expressed miR-504 in gastric cancer tissues regulates the biological behaviors of gastric cancer cell BGC-823 through TP53INP1

LIU Zhenyi, WENG Guowu, GUAN Liwen, ZHOU Zhenzhen, WANG Liya, FENG Hongjun (Department of Gastroenterology, Sanya Central Hospital & The Third People's Hospital of Hainan Province, Sanya 572000, Hainan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression level of microRNA-504 (miRNA-504) in gastric cancer (GC) tissues and its regulatory mechanism in the biological behaviors of GC cells. **Methods:** From June 2020 to December 2020, tumor tissues and corresponding para-cancerous tissues resected from 48 patients with gastric cancer were collected in the Department of Surgical, Sanya Central Hospital. qPCR was used to detect the mRNA levels of miR-504 and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) in the tissues, and WB assay was used to detect the protein level of TP53INP1. Human gastric cancer BGC-823 cells were cultured in vitro and divided into control group (normally cultured BGC-823 cells), miR-504 mimic group, mimic-NC group, miR-504 inhibitor group, inhibitor-NC group, miR-504 inhibitor+si-NC group, and miR-504 inhibitor+si-TP53INP1 group. qRT-PCR was used to detect mRNA expression of miR-504 and TP53INP1 in each group of cells. MTT method, Flow cytometry, Scratch test, and Transwell invasion assay were used to detect the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of the cells in each group. WB assay was used to detect the

[基金项目] 海南省卫生计生行业科研项目资助 (No. 16A200142); 三亚市医疗卫生科技创新项目资助 (No. 2017YW08)。Project supported by Scientific Research Project of Health and Family Planning Industry in Hainan Province (No. 16A200142), and the Sanya Medical and Health Science and Technology Innovation Project (No. 2017YW08)

[作者简介] 刘真义 (1986—), 男, 本科, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的基础和临床研究, E-mail: gdyxywkn@126.com

[通信作者] 冯红军 (FENG Hongjun, corresponding author), 硕士, 主任医师, 主要从事消化道肿瘤的研究, E-mail: 441540671@qq.com

protein expression of cell proliferation, migration, and invasion-related proteins (Cyclin D1, E-cadherin, MMP-2, MMP-9) and TP53INP1 in each group. Dual-luciferase reporter gene experiment was used to further verify the targeting relationship between miR-504 and TP53INP1. **Results:** Compared with the para-cancerous tissues, the expression of miR-504 in gastric cancer tissues was significantly increased ($P<0.05$), and the mRNA and protein expression levels of TP53INP1 were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The expression of miR-504 was negatively correlated with TP53INP1 mRNA ($P<0.01$). Compared with the control group, the expression of miR-504 in the BGC-823 cells of the miR-504 mimic group was significantly increased, while the mRNA and protein expression of TP53INP1 was significantly decreased (all $P<0.05$); moreover, the cell survival rate, scratch healing rate, the number of cells entering the lower layer of the Transwell chamber, and the expression of Cyclin D1, MMP-2, and MMP-9 were all significantly increased, while the apoptosis rate and the expression of E-cadherin were significantly decreased (all $P<0.05$) in miR-504 mimic group; However, the miR-504 inhibitor could significantly down-regulate the expression of miR-504, up-regulate the mRNA and protein expression of TP53INP1, inhibit cell proliferation, migration, and invasion, and promote cell apoptosis (all $P<0.05$) in BGC-823 cells. Down-regulating the expression of TP53INP1 could significantly reduce the inhibitory effect of down-regulation of miR-504 on the proliferation, migration, and invasion of BGC-823 cells; and miR-504 over-expression could obviously inhibit the luciferase activity of wild-type TP53INP1 plasmid (all $P<0.05$). **Conclusion:** miR-504 is highly expressed in gastric cancer tissues. Down-regulation of miR-504 can inhibit the malignant biological behaviors of gastric cancer BGC-823 cells and promote their apoptosis, and the mechanism may be related to the targeted regulation of the expression of TP53INP1.

[Key words] gastric cancer (GC); BGC-823 cell; microRNA-504; proliferation; apoptosis; migration; invasion; tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1)

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(8): 824-832. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.08.009]

胃癌(gastric carcinoma, GC)是一种常见的恶性肿瘤,具有很高的发病率和病死率^[1];约55%~60%的胃癌患者发生腹膜转移,是其高病死率的主要原因之一^[2]。尽管胃癌早期患者可以通过手术治疗,但是早期诊断率低,大部分患者发现时已处于中晚期,临床上建议将化学疗法作为首选治疗策略,但患者的预后较差^[3];而且胃癌的复发、转移、耐药等问题仍难以解决^[4]。因此,寻找胃癌进展过程中的关键分子对于研究胃癌的发病机制、提高治疗效率和改善预后至关重要。肿瘤蛋白53诱导型核蛋白1(tumor protein 53-induced nuclear protein 1, TP53INP1)是一种参与细胞应激反应的促凋亡蛋白,可通过调节p53转录活性诱导细胞生长停滞和凋亡^[5]。在宫颈癌^[6]、乳腺癌^[7]和胃癌^[8]等癌症中已经发现TP53INP1的表达降低。TP53INP1的过表达可诱导具有紫杉醇抗性的胃癌MGC-803R细胞的G1细胞周期阻滞并增加p53介导的细胞凋亡^[9]。然而,尚不清楚TP53INP1在GC中的调控机制。MicroRNA(miRNA, miR)表达失衡已被证明在肿瘤发生和发展中起重要的调节作用,已经发现了几种miRNA,如miR-515-3p^[10]、miR-20a^[11]和miR-551b^[12],在胃癌组织中存在表达异常,可以用作诊断和预后的潜在生物标志物。miR-504是p53的负向调控分子,其过度表达会降低p53蛋白水平,并损害p53功能^[13];在胃癌细胞中下调miR-504可通过激活p53诱导凋亡^[14];在骨肉瘤中miR-504的过度表达可通过靶向TP53INP1促进肿瘤的生长并增加转移^[15]。有研究者^[16]对TCGA数据库中胃正常组织和肿瘤组织中差异基因分析发现,

miR-504与胃癌增殖及凋亡密切相关,然而在胃癌组织中miR-504表达水平是否存在异常,以及其是否能调控TP53INP1影响胃癌细胞生物学行为还未可知。本研究检测胃癌组织中miR-504和TP53INP1的表达水平,并以人胃癌细胞BGC-823为对象,观察miR-504对BGC-823细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及其可能的作用机制。

1 资料与方法

1.1 临床标本采集

选取2020年6月至2020年12月三亚中心医院收治的48例胃癌患者的肿瘤组织与相应癌旁组织(距肿瘤边缘5 cm),通过病理检查确认所有标本为胃癌组织。患者基本资料见表1。组织样品用生理盐水冲洗后,保存在液氮中。本研究获得了医院伦理委员会的批准,所有患者均签署知情同意书。纳入标准:符合《胃癌诊断标准》中有关诊断标准,并经术后病理学诊断确诊,愿意配合研究;患者行胃癌根治性手术,临床病理资料完整;术前未行放疗、化疗和免疫治疗等;未发生肝、肺等远处转移;无合并其他肿瘤。排除标准:精神异常者;合并其他恶性肿瘤者;合并先天免疫功能缺陷或其他遗传病、严重肝肾功能障碍和严重急慢性感染性疾病者。

1.2 细胞、主要试剂与仪器

人胃癌细胞BGC-823购自上海青旗生物科技发展有限公司。胎牛血清、RPMI 1640培养基均购自美国Gibco公司,TRIzol RNA分离试剂及SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒均购自日本TaKaRa公司,

Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒购自美国 Thermo 公司, miR-504 模拟物(mimic)、miR-504 mimic 阴性对照(mimic-NC)、miR-504 抑制物(inhibitor)、miR-504 inhibitor 阴性对照(inhibitor-NC)、TP53INP1 mRNA 的干扰 RNA (si-TP53INP1)、干扰 RNA 的阴性对照 (si-NC) 及 PCR 引物序列均由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成, TP53INP1 siRNA 质粒及其空载体质粒均购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, MTT 法试剂盒、蛋白提取试剂盒、BCA 试剂盒均购自上海碧云天公司, 人工重构基底膜胶(Matrigel)购自美国 BD 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, 细胞凋亡(FITC-Annexin V/PI 法)流式检测试剂盒购自苏州宇恒生物科技有限公司, 荧光素酶测定试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 兔抗人 TP53INP1、E-cadherin、Cyclin D1、MMP-2、MMP-9、 β -actin 抗体和 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 均购自英国 Abcam 公司。Prism® 7300 型 qPCR 系统购自美国 ABI 公司, IX73 倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司, iMark680 多功能酶标仪、蛋白转膜装置均购自美国 Bio-Rad 公司。

表1 患者基本资料

Tab.1 Basic information of patients

Feature	Case (n)
Gender	
Female	18
Male	30
Age (t/a)	
<60	13
≥60	35
Location	
Gastric fundus-cardiac	22
Gastric body	17
Pylorus	9
T grade	
T1+T2	15
T3+T4	33
Tumor size (d/cm)	
≤5	29
>5	19
Lymph node metastasis	
Yes	20
No	28
Histological grade	
Low	37
Middle	10
High	1

1.3 细胞分组和转染

将对数生长期的 BGC-823 细胞分为空白对照组(正常培养的 BGC-823 细胞)、mimic-NC 组、miR-504 mimic 组、inhibitor-NC 组、miR-504 inhibitor 组、miR-504 inhibitor+si-NC 组(miR-504 抑制剂与 si-NC 共转染)、miR-504 inhibitor+si-TP53INP1 组(miR-504 抑制剂与 si-TP53INP1 共转染), 转染均参照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书进行操作;随后在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 48 h, 用 qPCR 检测转染效率。转染成功后, 用于后续实验。

1.4 qPCR 法检测胃癌组织和细胞 miR-504、TP53INP1 mRNA 的表达水平

TRIzol 法提取胃癌、癌旁组织和各组细胞中的总 RNA, 紫外分光光度计检测总 RNA 浓度和纯度。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA, 进行 qPCR 扩增。反应体系(25 μ l): SYBR® Premix Ex Taq™ (2 $\times$) 12.5 μ l, 上下游引物各 0.5 μ l, cDNA (200 ng/ μ l) 1 μ l, ddH₂O 11 μ l。反应条件: 95 °C 预变性 5 min 之后, 95 °C 变性 15 s、60 °C 退火 20 s、72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环。以 U6 或 β -actin 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算目的基因的相对表达量。qPCR 所用引物序列见表 2。

表2 引物序列

Tab.2 Primer sequence

Gene	Primer sequence
miR-504	F: 5'-CCAGCAAGACCCTGGTCTG-3' R: 5'-AGAGCAGGGTCCGAGGTA-3'
U6	F: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3' R: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTCAT-3'
TP53INP1	F: 5'-TTCCTCCAACACAAACACGAGA-3' R: 5'-GCTCAGTAGGTGACTCTTCTCACT-3'
β -actin	F: 5'-TTGCGTTACACCCTTTCTTG-3' R: 5'-TGTCACCTTACCGTTCCA-3'

1.5 MTT 法检测细胞增殖水平

取各组 BGC-823 细胞, 胰蛋白酶消化后将细胞悬液密度调整为 4 $\times$ 10⁴ 个/ml, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ l。待细胞贴壁后, 按照 1.3 项下操作进行分组和处理细胞, 培养 48 h 后, 每孔中加入 20 μ l 的 MTT 溶液(5 mg/ml), 于培养箱中孵育 4 h, 吸去上层清液后加入 150 μ l 的 DMSO, 测定 490 nm 波长处各孔光密度(D)值, 计算细胞增殖率。细胞增殖率=实验组 D 值/对照组 D 值 $\times$ 100%。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

取转染后的各组 BGC-823 细胞, 培养 48 h, 胰蛋

白酶消化制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^6 个/ml, 向 EP 管中加入 100 μ l 细胞悬液, 然后加入 Annexin V-FITC 和 PI 染色液各 5 μ l, 避光孵育 15 min 后加入 $1 \times$ 结合缓冲液 400 μ l, 1 h 内使用流式细胞仪检测各组 BGC-823 细胞凋亡率。

1.7 划痕实验检测细胞迁移能力

取转染 48 h 后的各组 BGC-823 细胞, 接种于 6 孔板中, 待细胞完全贴壁后, 用移液器吸头尖端在每个孔内划一道痕, 置于培养箱中继续培养, 然后在倒置显微镜下分别在同一位置于 0 和 48 h 时拍照, 观察划痕愈合情况, 计算划痕愈合率。划痕愈合率 = $(1 - 48 \text{ h 时划痕宽度} / 0 \text{ h 时划痕宽度}) \times 100\%$

1.8 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

取转染 48 h 后的各组 BGC-823 细胞, 用无血清的细胞培养液调整细胞密度为 5×10^4 个/ml, 将 Matrigel 胶稀释后加到 Transwell 上室, 过夜晾干后, 分别加入 200 μ l 细胞悬液 (无血清培养基), 下室加入 400 μ l 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 24 h, 取出 Transwell 小室, 95% 乙醇固定, 0.1% 结晶紫染液染色, ddH₂O 清洗小室下表面, 用湿棉签小心擦除上室底部膜表面的细胞, 晾干后在显微镜下随机取 3 个视野, 拍照, 计数穿膜细胞。

1.9 WB 法检测细胞中 TP53INP1 以及增殖、迁移相关蛋白的表达

使用 RIPA 裂解液提取各组细胞中总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定总蛋白浓度。取等量蛋白质样品 (30 μ g) 上样, 然后进行 SDS-PAGE 以蛋白分离, 随后将蛋白条带转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶封闭, 并在 4°C 下与一抗 [TP53INP1 (1:2 000)、Cyclin D1 (1:200)、E-cadherin (1:1 000)、MMP-2 (1:1 000)、MMP-9 (1:1 000) 和 β -actin (1:2 000) 抗体] 孵育过夜。次日, 洗去一抗, 加入二抗 (HRP 标记的山羊抗兔 IgG) 孵育 2 h, 然后使用化学发光 (ECL) 试剂盒进行

显色。以 β -actin 为内参分析各相关蛋白质的表达量。

1.10 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-504 与 TP53INP1 mRNA 之间的靶向关系

miRanda 网站目标预测分析显示, TP53INP1 mRNA 的 3'UTR 与 miR-504 之间的序列存在互补性, TP53INP1 是 miR-504 的潜在靶标, 进行荧光素酶报告基因测定以验证生物信息学分析的结果。将 A549 细胞接种到 96 孔板 (2×10^3 个/孔) 中, 并在 RPMI 1640 培养基中孵育至细胞 60% 汇合。随后, 使用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂 (0.2 μ l) 对 50 ng miR-504 mimic 或 miR-NC、TP53INP1-3'UTR 野生型 (WT) 或 TP53INP1-3'UTR 突变体 (MUT) 质粒进行共转染。转染 48 h 后, 按照试剂盒说明书的操作使用荧光素酶测定试剂盒测定细胞中荧光素酶的活性。

1.11 统计学处理

以上所有实验均独立重复 3 次。所得数据采用 SPSS 22.0 和 Image-Pro Plus 6.0 软件进行分析, 正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 多组中两两差异进一步采用 SNK-Q 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中 miR-504 和 TP53INP1 mRNA 的表达

qPCR 检测结果 (图 1) 显示, 与癌旁组织相比, 胃癌组织中 miR-504 的表达显著升高 ($P < 0.05$), 而 TP53INP1 mRNA 表达水平显著降低 (均 $P < 0.05$); WB 检测结果 (图 2) 显示, 胃癌组织中 TP53INP1 的表达水平也显著低于癌旁组织 (0.49 ± 0.05 vs 1.00 ± 0.00 , $t = 70.67$, $P < 0.01$)。

通过 Pearson 相关性检验分析 miR-504 与 TP53INP1 mRNA 相对表达量之间的相关性, 结果 (图 3) 显示, 实验组胃癌组织中 miR-504 的表达与 TP53INP1 mRNA 的表达呈负相关 ($r = -0.647$, $P < 0.01$)。

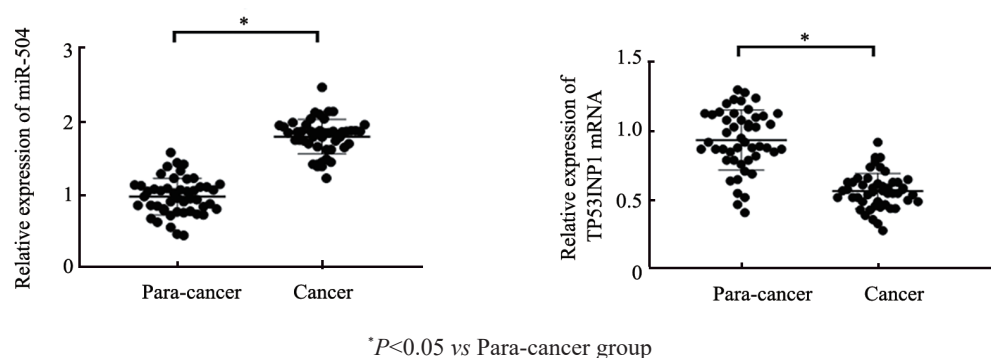


图 1 胃癌组织中 miR-504 和 TP53INP1 mRNA 的表达 ($n=48$)

Fig.1 mRNA expression of miR-504 and TP53INP1 in gastric cancer tissues

2.2 BGC-823 细胞中 miR-504、TP53INP1 mRNA 表达情况

qPCR 检测结果(图4)显示,对照组、mimic-NC 组和 inhibitor-NC 组 BGC-823 细胞中 miR-504 和 TP53INP1 mRNA 表达水平差异无统计学意义(均 $P>0.05$);与对照组相比,miR-504 mimic 组细胞中 miR-504 的表达显著升高,TP53INP1 mRNA 的表达显著降低($P<0.05$),而 miR-504 inhibitor 组细胞中 miR-504 的表达显著降低,TP53INP1 mRNA 的表达显著增加($P<0.05$);与 miR-504 inhibitor 组相比,miR-504 inhibitor+si-TP53INP1 组细胞中 TP53INP1 mRNA 的表达明显降低($P<0.05$)。

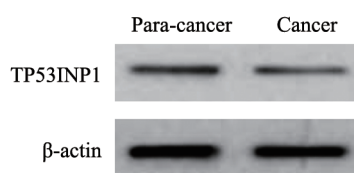


图2 胃癌组织中 TP53INP1 的表达

Fig.2 Expression of TP53INP1 in gastric cancer tissues

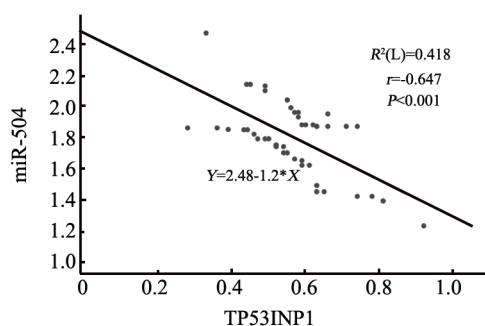
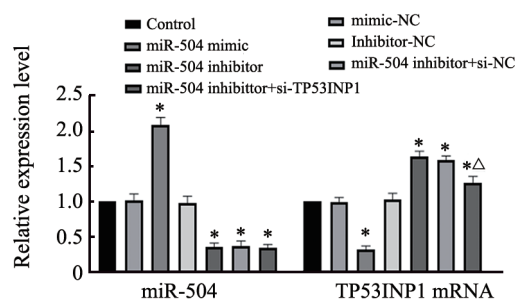


图3 胃癌组织中 miR-504 和 TP53INP1 mRNA 表达的相关性分析

Fig.3 Correlation analysis of mRNA expression of miR-504 and TP53INP1 in gastric cancer tissues



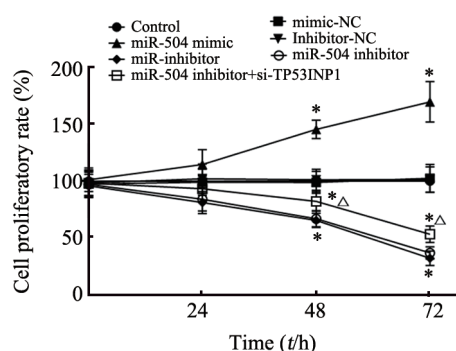
* $P<0.05$ vs Control group; $\Delta P<0.05$ vs miR-504 inhibitor group

图4 BGC-823 细胞中 miR-504、TP53INP1 mRNA 的表达水平($n=3$)

Fig.4 The mRNA expression levels of miR-504 and TP53INP1 in BGC-823 cells

2.3 miR-504 和 TP53INP1 对 BGC-823 细胞增殖的影响

CCK-8 法检测结果(图5)显示,与对照组相比, mimic-NC 组和 inhibitor-NC 组 BGC-823 细胞的存活率差异无统计学意义(均 $P>0.05$),miR-504 mimic 组细胞增殖率显著增加($P<0.05$),而 miR-504 inhibitor 组细胞增殖率显著降低($P<0.05$);与 miR-504 inhibitor 组相比,miR-504 inhibitor+si-TP53INP1 组细胞增殖率明显增加($P<0.05$)。



* $P<0.05$ vs Control group; $\Delta P<0.05$ vs miR-504 inhibitor group

图5 miR-504 和 TP53INP1 对 BGC-823 细胞增殖的影响

Fig.5 Effects of miR-504 and TP53INP1 on the proliferation of BGC-823 cells

2.4 miR-504 和 TP53INP1 对 BGC-823 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果(图6)显示,与对照组相比, mimic-NC 组和 inhibitor-NC 组 BGC-823 细胞的凋亡率差异无统计学意义(均 $P>0.05$),miR-504 mimic 组细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),而 miR-504 inhibitor 组细胞凋亡率显著增加($P<0.05$);与 miR-504 inhibitor 组相比,miR-504 inhibitor+si-TP53INP1 组细胞凋亡率明显降低($P<0.05$)。

2.5 miR-504 和 TP53INP1 对 BGC-823 细胞迁移的影响

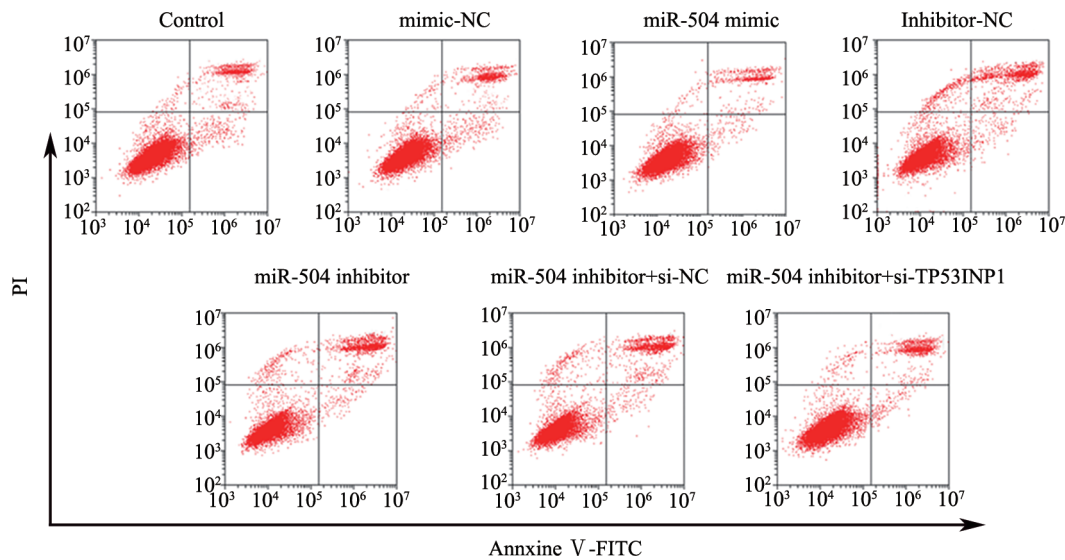
划痕实验结果(图7)显示,与对照组相比, mimic-NC 组和 inhibitor-NC 组划痕愈合率差异无统计学意义(均 $P>0.05$),miR-504 mimic 组细胞明显向划痕区域迁移,划痕愈合率显著增加($P<0.05$),而 miR-504 inhibitor 组细胞向划痕区域的迁移程度受到抑制,划痕愈合率显著降低($P<0.05$);与 miR-504 inhibitor 组相比,miR-504 inhibitor+si-TP53INP1 组细胞划痕愈合率明显增加($P<0.05$)。

2.6 miR-504 和 TP53INP1 对 BGC-823 细胞侵袭的影响

Transwell 侵袭实验检测结果(图8)显示,与对照组相比, mimic-NC 组和 inhibitor-NC 组 BGC-823 细胞

穿膜数差异无统计学意义(均 $P>0.05$), miR-504 mimic 组穿膜细胞数显著增加($P<0.05$), 而 miR-504 inhibitor 组穿膜细胞数显著降低($P<0.05$); 与 miR-

504 inhibitor 组相比, miR-504 inhibitor+si-TP53INP1 组穿膜细胞数明显增加($P<0.05$)。



* $P<0.05$ vs Control group; $\Delta P<0.05$ vs miR-504 inhibitor group

图6 miR-504 和 TP53INP1 对 BGC-823 细胞凋亡的影响

Fig.6 Effects of miR-504 and TP53INP1 on apoptosis of BGC-823 cells

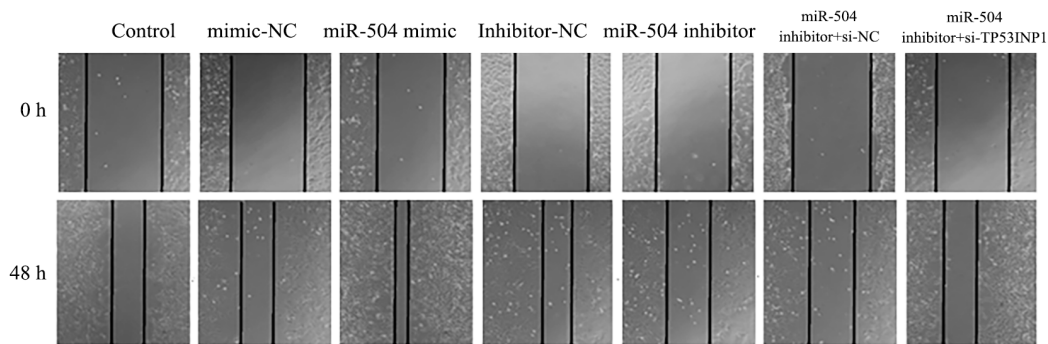


图7 miR-504 和 TP53INP1 对 BGC-823 细胞迁移的影响

Fig.7 Effects of miR-504 and TP53INP1 on the migration of BGC-823 cells

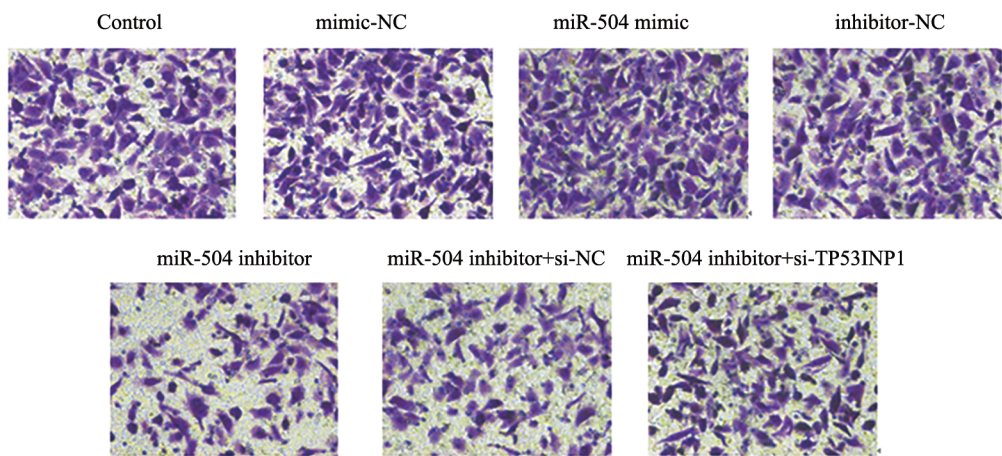


图8 miR-504 和 TP53INP1 对 BGC-823 细胞侵袭的影响

Fig.8 Effects of miR-504 and TP53INP1 on the invasion of BGC-823 cells

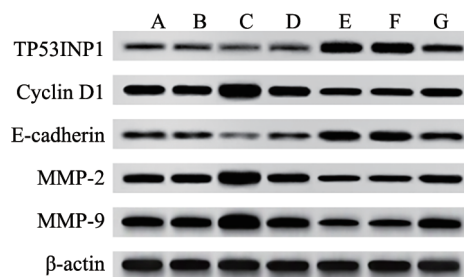
2.7 miR-504和TP53INP1对BGC-823细胞TP53INP1、增殖和迁移相关蛋白表达的影响

WB检测结果(图9、表3)显示,与对照组相比,mimic-NC组和inhibitor-NC组BGC-823细胞中所测蛋白表达差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),miR-504 mimic组细胞中TP53INP1、E-cadherin的表达显著降低,Cyclin D1、MMP-2、MMP-9表达显著增加(均 $P<0.05$),而miR-504 inhibitor组细胞中TP53INP1、E-cadherin表达显著增加,CyclinD1、MMP-2、MMP-9表达显著降低(均 $P<0.05$);与miR-504 inhibitor组相比,miR-504 inhibitor+si-TP53INP1组细胞TP53INP1、E-cadherin的表达明显降低,Cyclin D1、MMP-2、MMP-9表达明显增加(均 $P<0.05$)。

2.8 TP53INP1基因是miR-504的直接靶标

通过miRanda数据库预测发现,TP53INP1 mRNA包含miR-504的结合位点(图10A)。双荧光素酶报告基因结果(图10B)显示,TP53INP1-3'UTR-

WT+miR-504 mimic组的萤光素酶活性显著降低($P<0.05$)。



A: Control; B: mimic-NC; C: miR-504 mimic; D: inhibitor-NC; E: miR-504 inhibitor; F: miR-504 inhibitor+si-NC; G: miR-504 inhibitor+si-TP53INP1

图9 各组胃癌BGC-823细胞TP53INP1、增殖和迁移相关蛋白的表达

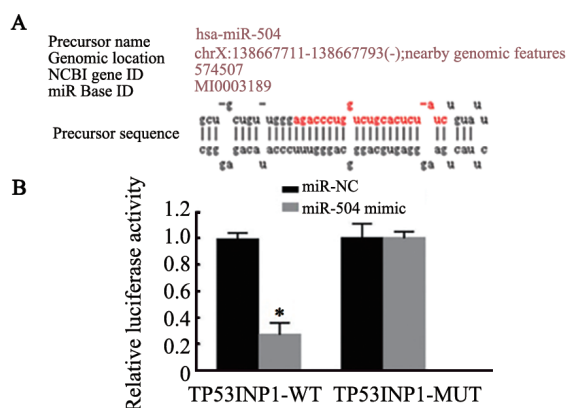
Fig.9 Expression of TP53INP1, proliferation and migration related proteins in BGC-823 cells of each group

表3 各组胃癌BGC-823细胞TP53INP1、增殖和迁移相关蛋白的表达

Tab.3 Expression of TP53INP1, proliferation and migration related proteins in BGC-823 cells of each group

Group	TP53INP1	Cyclin D1	E-cadherin	MMP-2	MMP-9
Control	0.21±0.02	0.85±0.10	0.31±0.05	0.76±0.08	0.83±0.10
mimic-NC	0.23±0.03	0.86±0.11	0.34±0.04	0.77±0.09	0.85±0.09
miR-504 mimic	0.14±0.02*	1.43±0.15*	0.15±0.03*	1.23±0.08*	1.41±0.13*
inhibitor-NC	0.20±0.03	0.83±0.09	0.30±0.04	0.79±0.10	0.87±0.11
miR-504 inhibitor	0.87±0.05*	0.41±0.06*	0.88±0.07*	0.43±0.05*	0.54±0.06*
miR-504 inhibitor+si-NC	0.91±0.06*	0.45±0.05*	0.85±0.09*	0.41±0.04*	0.51±0.05*
miR-504 inhibitor+si-TP53INP1	0.43±0.04* ^Δ	0.62±0.08* ^Δ	0.49±0.05* ^Δ	0.65±0.07* ^Δ	0.73±0.08* ^Δ

* $P<0.05$ vs Control group; ^Δ $P<0.05$ vs miR-504 inhibitor group



* $P<0.05$ vs miR-NC group

A: Binding site of TP53INP1 mRNA and miR-504; B: Dual luciferase reporter gene experiment verified the targeting relationship between TP53INP1 mRNA and miR-504

图10 TP53INP1基因是miR-504的直接靶标

Fig.10 TP53INP1 gene was proved to be a direct target of miR-504

3 讨论

TP53INP1基因位于人类染色体8q22上,是一种抗增殖和促凋亡蛋白,也是p53介导的细胞周期停滞和细胞凋亡中的关键调控基因,对于细胞的增殖、凋亡、侵袭等具有重要作用^[17]。作为肿瘤抑制物,TP53INP1在不同器官的癌症中均被下调^[6-7]。JIANG等^[8]对142例胃癌患者组织中TP53INP1的表达进行检测发现,TP53INP1在非癌性胃组织中呈高表达,在胃癌病灶中其表达显著降低,并且TP53INP1阳性组织的凋亡指数显著高于TP53INP1阴性组织,其低表达与胃癌的侵袭性和凋亡显著相关;其表达的降低可能反映了胃癌的恶性程度,对预测不良预后具有重要影响。DOU等^[18]发现,上调TP53INP1的表达可抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭。因此,靶向调节TP53INP1的表达可能对提高GC的治疗效率和改善预后具有重要影响。

近年来发现,TP53INP1的表达受miRNA的调控,如miR-15a-5p的下调通过直接靶向上调TP53INP1可抑制宫颈癌细胞的增殖并增加细胞凋亡^[6];miR-155-5p可通过靶向抑制TP53INP1的表达促进胃癌细胞的增殖和迁移^[19]。SOUTTO等^[14]发现,在胃癌细胞中下调miR-504可激活p53,进而抑制细胞生长并诱导凋亡。miR-504是一种可以通过与人p53基因3'-UTR的两个结合位点结合来调节p53表达的miRNA,其过度表达会降低p53蛋白水平,从而对p53的功能产生负调控(如p53介导的转录激活、细胞凋亡和细胞周期停滞),其为p53的负向调节剂^[13]。而p53的功能受TP53INP1的调节。研究发现TP53INP1可通过与同源域相互作用蛋白激酶2(homeodomain interacting protein kinase 2, HIPK2)或蛋白激酶C δ (protein kinase C δ , PKC δ)形成蛋白复合物,使p53丝氨酸(Ser-46)磷酸化,从而导致p53靶基因转录和p53依赖性细胞凋亡途径的激活^[17,20]。CAI等^[15]发现,骨肉瘤组织中miR-504的表达高于癌旁正常组织,且与肿瘤的大小和临床分期有关;miR-504在骨肉瘤中可通过靶向TP53INP1来增强骨肉瘤的生长并促进远处转移。因此,miR-504调节p53功能的机制可能与TP53INP1有关。

有研究者^[16]对胃癌患者肿瘤组织与正常组织中的差异基因进行分析发现,miR-504与GC细胞的增殖及凋亡密切相关。本研究发现,miR-504在胃癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织,而TP53INP1 mRNA的表达在癌组织中显著降低;通过向胃癌BGC-823细胞中转染miR-504 mimic上调miR-504的表达后,发现TP53INP1的表达显著降低,且BGC-823细胞增殖活性增强、凋亡减少,迁移、侵袭能力增加;而通过转染miR-504 inhibitor下调miR-504的表达后,TP53INP1的表达增加,BGC-823细胞的凋亡增加,增殖、迁移与侵袭能力受到抑制;WB检测结果也显示,与细胞增殖相关的细胞周期蛋白Cyclin D1的表达显著降低,迁移相关蛋白E-cadherin表达显著增加、MMP-2和MMP-9的表达降低,表明肿瘤细胞黏附能力增强、浸润转移能力减弱;结果提示在BGC-823细胞中,miR-504可能对TP53INP1表达具有调节作用。通过miRanda数据库分析和荧光素酶报告基因实验测定证实,miR-504是靶向TP53INP1的调节分子。由此推测,miR-504可能通过调节TP53INP1的表达,参与胃癌的发生和发展。为了验证此猜想,本研究同时下调BGC-823细胞miR-504和TP53INP1的表达,发现干扰TP53INP1表达后,下调miR-504表达对细胞增殖、迁移与侵袭的抑制作用被明显减弱而细胞凋亡增加;结果提示,下调miR-504可靶向上

调TP53INP1的表达,进而影响胃癌细胞生物学行为。

综上所述,miR-504在胃癌组织中的表达显著升高,下调miR-504的表达可抑制胃癌BGC-823细胞的增殖、迁移与侵袭,并促进细胞凋亡;其作用机制可能与靶向调控TP53INP1的表达有关。本研究在细胞水平初步探讨了miR-504与TP53INP1在BGC-823细胞中的相互作用,由于体内外肿瘤微环境存在差异,下一步考虑建立裸鼠荷瘤模型,从体内进行深入研究,以期对胃癌的诊断及治疗提供帮助。

[参 考 文 献]

- [1] YU S, HU C, CAI L, et al. Seven-gene signature based on glycolysis is closely related to the prognosis and tumor immune infiltration of patients with gastric cancer[J/OL]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1778 [2021-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33072557/>. DOI: 10.3389/fonc.2020.01778.
- [2] YAO X, AJANI J A, SONG S. Molecular biology and immunology of gastric cancer peritoneal metastasis[J/OL]. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5: 57 [2021-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33073052/>. DOI:10.21037/tgh.2020.02.08.
- [3] ARIGAMI T, MATSUSHITA D, OKUBO K, et al. Recurrent gastric cancer sustaining a partial response after the nivolumab discontinuation because of immune-related adverse events: a case report[J/OL]. *Surg Case Rep*, 2020, 6(1): 271 [2021-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33074364/>. DOI: 10.1186/s40792-020-01050-1.
- [4] XU Y D, SHANG J, LI M, et al. lncRNA DANCER accelerates the development of multidrug resistance of gastric cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(7): 2794-2802. DOI: 10.26355/eurev_201904_17554.
- [5] SEUX M, PEUGET S, MONTERO M P, et al. TP53INP1 decreases pancreatic cancer cell migration by regulating SPARC expression[J]. *Oncogene*, 2011, 30(27): 3049-3061. DOI:10.1038/onc.2011.25.
- [6] ZHAO X Q, TANG H, YANG J, et al. MicroRNA-15a-5p down-regulation inhibits cervical cancer by targeting TP53INP1 in vitro[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(19): 8219-8229. DOI: 10.26355/eurev_201910_19129.
- [7] NISHIMOTO M, NISHIKAWA S, KONDO N, et al. Prognostic impact of TP53INP1 gene expression in estrogen receptor α -positive breast cancer patients[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2019, 49(6): 567-575. DOI: 10.1093/jjco/hyz029.
- [8] JIANG P H, MOTOO Y, GARCIA S, et al. Down-expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 in human gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(5): 691-696. DOI: 10.3748/wjg.v12.i5.691.
- [9] WANG M, QIU R, YU S, et al. Paclitaxel-resistant gastric cancer MGC-803 cells promote epithelial-to-mesenchymal transition and chemoresistance in paclitaxel-sensitive cells via exosomal delivery of miR-155-5p[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(1): 326-338. DOI:10.3892/ijo.2018.4601.
- [10] HAN X, LI X, ZHAO H, et al. Serum miR-515-3p, a potential new

- RNA biomarker, is involved in gastric carcinoma[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 15834-15843. DOI:10.1002/jcb.28854.
- [11] SUN H, WANG Q, YUAN G, et al. Hsa_circ_0001649 restrains gastric carcinoma growth and metastasis by downregulation of miR-20a[J/OL]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(6): e23235 [2021-04-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32212290/>. DOI: 10.1002/jcla.23235.
- [12] WANG Y, FAN X, XU F, et al. Expression of miR-551b and its effect on apoptosis in human gastric carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(5): 2912-2919.
- [13] HU W, CHAN C S, WU R, et al. Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504[J]. *Mol Cell*, 2010, 38(5): 689-699. DOI:10.1016/j.molcel.2010.05.027.
- [14] SOUTTO M, CHEN Z, SALEH M A, et al. TFF1 activates p53 through down-regulation of miR-504 in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(14): 5663-5673. DOI:10.18632/oncotarget.2156.
- [15] CAI Q, ZENG S, DAI X, et al. miR-504 promotes tumour growth and metastasis in human osteosarcoma by targeting TP53INP1[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(5): 2993-3000. DOI:10.3892/or.2017.5983.
- [16] 谢红. Hsa-miR-504-3p 通过调控 CHEK1 抑制胃癌细胞增殖并诱导凋亡[D]. 衡阳: 南华大学, 2020.
- [17] SHAHBAZI J, LOCK R, LIU T. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 enhances p53 function and represses tumorigenesis[J/OL]. *Front Genet*, 2013, 4: 80 [2021-04-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717325/>. DOI:10.3389/fgene.2013.00080.
- [18] DOU J, TU D, ZHAO H, et al. lncRNA PCAT18/miR-301a/TP53INP1 axis is involved in gastric cancer cell viability, migration and invasion[J]. *J Biochem*, 2020, 168(5): 547-555. DOI: 10.1093/jb/mvaa079.
- [19] SHI S S, ZHANG H P, YANG C Q, et al. Exosomal miR-155-5p promotes proliferation and migration of gastric cancer cells by inhibiting TP53INP1 expression[J/OL]. *Pathol - Res Pract*, 2020, 216(6): 152986 [2021-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32527448/>. DOI:10.1016/j.prp.2020.152986.
- [20] TOMASINI R, SAMIR A A, CARRIER A, et al. TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK₂) are partners in regulating p53 activity[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(39): 37722-37729. DOI:10.1074/jbc.m301979200.
- [收稿日期] 2021-04-15 [修回日期] 2021-07-29
[本文编辑] 黄静怡