

# miR-124 通过靶向调控 DNMT3B 抑制胃癌细胞增殖

谢黎明<sup>1</sup>, 贺荣芳<sup>1</sup>, 张志伟<sup>2</sup>, 贺修胜<sup>1</sup>

(1. 南华大学附属第一医院肿瘤内科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学肿瘤研究所)

**摘要:** **目的** 明确 miR-124 是否通过靶向调控 DNA 甲基化转移酶 3B(DNA methyltransferase 3B, DNMT3B) 表达而抑制胃癌细胞增殖能力, 从而揭示 miR-124 的抑癌分子机制。 **方法** 采用 MTT 检测 miR-124 对人胃癌 MKN-45 细胞的增殖能力; 构建 DNMT3B 3'UTR-荧光素酶报告载体, 通过荧光素酶报告检测观察 miR-124 对 DNMT3B 3'UTR-荧光素酶活性的影响; 将 miR-124 mimics 转染胃癌细胞 MKN-45, 采用 Western blot 检测 DNMT3B 表达水平。 **结果** MTT 结果显示, 在转染 miR-124 mimics 24、48 和 72 h 后 OD 值( $0.264 \pm 0.023$ 、 $0.377 \pm 0.041$ 、 $0.524 \pm 0.029$ ) 分别与对照组( $0.414 \pm 0.051$ 、 $0.619 \pm 0.065$ 、 $0.898 \pm 0.072$ ) 比较, 差异均有显著性(均  $P < 0.05$ ), 且具有时间依赖性; 荧光素酶报告载体系统证实 DNMT3B 是 miR-124 直接调控的靶基因。Western blot 结果显示, miR-124 可抑制 DNMT3B 蛋白的表达。 **结论** miR-124 通过靶向调控 DNMT3B 的表达而抑制胃癌细胞增殖能力。

**关键词:** 胃癌; miR-124; DNMT3B; 细胞增殖

中图分类号:R735.2 文献标识码:A

## MiR-124 Suppresses Cell Proliferation by Targeting DNMT3B in Gastric Carcinoma

XIE Liming, HE Rongfang, ZHANG Zhiwei, et al

(Department of Medical Oncology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** To explicit whether miR-124 suppresses cell proliferation by targeting DNMT3B, thus to reveal molecular mechanism of miR-124 function as a tumorsuppressor in gastric carcinoma. **Methods** DNMT3B 3'UTR-luciferase vector was constructed and luciferase reporter gene assay was employed to examine the effect of miR-124 on luciferase activity. MKN-45 cells were transfected with miR-124 mimics, and next Western blotting was performed to detect the expressions of DNMT3B protein. **Results** After transfection of miR-124 mimics for 24 h, 48 h, 72 h respectively, MTT assay showed that the OD values were ( $0.264 \pm 0.023$ ), ( $0.377 \pm 0.041$ ) and ( $0.524 \pm 0.029$ ), compared with the control group ( $0.414 \pm 0.051$ ), ( $0.619 \pm 0.065$ ) and ( $0.898 \pm 0.072$ ), the groups were significantly different (all  $P < 0.05$ ), and it is on a time-dependent manner. Luciferase reporter vector system confirmed that DNMT3B was a target gene of miR-124. Western blot showed that the expressions of DNMT3B protein were inhibited by miR-124. **Conclusion** miR-124 suppresses cell proliferation by targeting DNMT3B in gastric carcinoma.

**Key words:** gastric carcinoma; miR-124; DNMT3B; cell proliferation

miRNA 与蛋白编码基因一样, 具有主要的生物学功能, 大多数 miRNA 在肿瘤中发挥主要功能作

用。有的 miRNA 表现出很强的致癌特性, 而有的 miRNA 则表现出很强的抑癌特性<sup>[1]</sup>。其中关于 miRNA 可作为抑癌基因参与肿瘤的发生发展的报道越来越多。研究表明, miR-124 在肝癌和宫颈癌细胞或细胞中表达下调<sup>[2-3]</sup>, miR-124 可通过靶向 CDK6 抑制髓母细胞瘤细胞的生长与浸润, 也可通过靶向 ITGB1 抑制口腔鳞状细胞癌的生长<sup>[4-6]</sup>, 同

收稿日期:2012-11-13

基金项目:国家自然科学基金(31100935)。

作者简介:谢黎明, 硕士, 主治医师, 研究方向:胃癌的肿瘤病因学研究, E-mail:xlmcz2008@yahoo.cn. 通讯作者贺修胜, 博士, 博士生导师, 教授, E-mail:hexiusheng118@yahoo.com.cn.

时 miR-124 与 miR-137 能促进 CD133 阳性肿瘤干细胞的分化,抑制癌细胞的增殖,细胞周期蛋白激酶 CDK6 是它们的作用靶点<sup>[7]</sup>。

本文前期结果发现 miR-124 在胃癌组织中表达下调,且与胃癌的临床分期、分化程度以及淋巴结转移相关<sup>[8]</sup>。本研究采用 MTT、荧光素报告载体、Western blot 等技术,分析 miR-124 在人胃癌 MKN-45 细胞中的作用机制,为进一步阐明胃癌发生发展的分子机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

miR-124 mimics 为 Qiagen 公司产品。荧光素酶活性检测试剂盒购自 Promega 公司。DNMT3B 抗体和  $\beta$ -actin 抗体购自 CST 公司。Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司。PRIM1640 培养基为 Gibco 公司产品。胎牛血清来自杭州四季青公司。MTT 购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 MTT 法检测细胞增殖活性

将 miR-124 mimics 转染的 MKN-45 细胞,消化后接种细胞于 96 孔板中,每组设 6 个平行复孔,放 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。在未接种细胞的孔中加入 RPMI-1640 培养基中作为调零孔。接种后 24、48 和 72 h 各检测一次。检测时每孔加 20  $\mu$ L MTS 检测试剂,37 °C 孵育 2 h,用酶标仪测定 492 nm 波长吸光度值(OD<sub>492</sub>)。实验重复 3 次。

### 1.3 靶基因 DNMT3B 的验证

通过 targetscan 6.2 在线软件预测 miR-124 调控的靶基因,选取包含 miR-124 结合位点的 DNMT3B 3'UTR 片段序列插入报告质粒;同时设计 DNMT3B 3'UTR 缺失 miR-124 结合位点的突变序列(invitrogen 公司合成)插入报告质粒;将 miR-124 mimics 与 pMIR-REPORT/DNMT3B UTR 质粒共转染胃癌 MKN-45 细胞,进行荧光素酶活性检测。

### 1.4 Western blot

将 miR-124 mimics 或 Negative control 转染 MKN-45 细胞,48 h 后提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取等量样本,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,然后将蛋白转移至 PVDF 膜上,1% BSA 封闭后,加入 DNMT3B 抗体或 GAPDH 抗体,4 °C 过夜。TBST 洗膜 10 min,加入二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 10 min,加入 ECL 发光剂、X

片曝光、显影、定影。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。所有数据均以均数  $\pm$  标准差表示。两组间比较用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结 果

### 2.1 MTT 检测 miR-124 对胃癌 MKN-45 细胞生长的影响

在转染 miR-124 mimics 24、48、72 h 后 OD 值(0.264  $\pm$  0.023、0.377  $\pm$  0.041、0.524  $\pm$  0.029)分别与对照组(0.414  $\pm$  0.051、0.619  $\pm$  0.065、0.898  $\pm$  0.072)比较,差异均有显著性(均  $P < 0.05$ ),且具有时间依赖性,即高表达 miR-124 可抑制胃癌 MKN-45 细胞的生长。

### 2.2 miR-124 直接调控其靶基因 DNMT3B 的表达

在胃癌 MKN-45 细胞共转染 miR-124 mimics 和野生型(Wt-miR-124/DNMT3B)或突变型(Mut-miR-124/DNMT3B)重组质粒,单光子检测发现,miR-124 mimics 对突变型 Mut-miR-124/DNMT3B 质粒组荧光素酶活性强度无明显影响,但对野生型 Wt-miR-124/DNMT3B 报告质粒组荧光素酶活性强度下降了约 49%。差异有显著性( $P < 0.01$ ,图 1)。在胃癌 MKN-45 细胞中转染 miR-124 mimics,以转染无关序列(negative control)为对照,转染 24 h 后检测 DNMT3B 蛋白表达情况。Western blot 结果显示,在胃癌 MKN-45 细胞中转染 miR-124 mimics 24 h 后 DNMT3B 蛋白表达下调(图 2)。结果表明,高表达 miR-124 能抑制胃癌 MKN-45 细胞 DNMT3B 蛋白的表达,进一步证实 DNMT3B 是 miR-124 直接调控的靶基因。

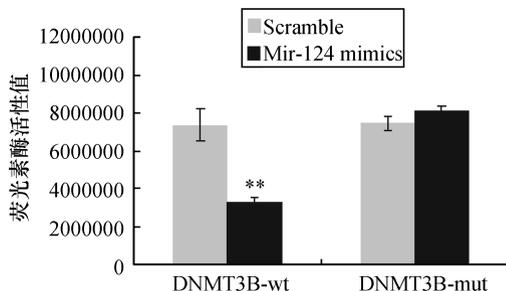


图 1 荧光素酶活性检测 miR-124 与 DNMT3B 3'UTR 结合在 MKN-45 细胞中共转染 miR-124 mimics 与 DNMT3B 3'UTR Wt/Mut 质粒,miR-124 能抑制 Wt 质粒荧光素酶活性,与 scramble 组比较, \*\*  $P < 0.01$ ,但对 Mut 质粒荧光素酶活性无变化

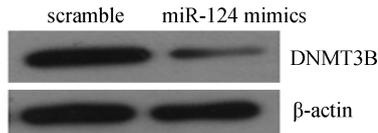


图2 Western blot 检测高表达 miR-124 对胃癌 MKN-45 细胞 DNMT3B 蛋白水平的影响

### 3 讨 论

microRNA 为长度约 21 ~ 25 个核苷酸的非编码 RNA, miRNA 能够识别特定的目标 mRNA 并在转录后水平通过促进靶 mRNA 的降解和/或抑制翻译过程而发挥负调控基因表达的作用, 它们通过调节信号分子的表达参与动植物的生长、分化和发育<sup>[9-10]</sup>。Ghanta 等<sup>[1]</sup>通过自己建立的人类 miRNA 疾病数据库整理出几十个致癌 miRNA 和抑瘤 miRNA, 并对其功能、表达、进化、基因组分布、靶基因及转录因子等进行了全面的系统生物学分析, 发现在功能上致癌 miRNA 更倾向于促进细胞增殖、抑制凋亡、抑制免疫细胞发育、控制细胞周期等, 而抑瘤 miRNA 更倾向于抑制细胞生长侵袭、促进凋亡等。本课题组前期研究中采用原位杂交检测了 miR-124 在胃癌组织中的表达情况。结果显示, miR-124 在胃癌组织中显著下调, 且 miR-124 的表达随着胃癌临床分期演进和浸润深度的增加而下调, 与胃癌的分化程度相关, 分化越差其表达越低; 有淋巴结转移的 miR-124 的表达显著低于无淋巴结转移组<sup>[8]</sup>。这些结果表明 miR-124 在胃癌中可能是一个具有抑瘤功能的 miRNA, 但其抑瘤分子机制目前并不是很清楚。

本课题通过 MTT 证实了 miR-124 具有抑制人胃癌 MKN-45 细胞生长的作用。研究表明, DNA 甲基转移酶有两种: (1) DNMT1, 持续性 DNA 甲基转移酶, 作用于仅有一条链甲基化的 DNA 双链, 使其完全甲基化; (2) DNMT3A、DNMT3B 从头甲基转移酶, 它们可甲基化 CpG, 使其半甲基化, 继而全甲基化。研究证实 miR-29 基因簇能下调肺癌细胞中 DNMT3A、DNMT3B 的表达, 重新激活抑瘤基因 FHIT 和 WWOX 的表达, 而发挥抑瘤作用<sup>[11]</sup>。目前最直接的方法就是荧光素报告载体系统证实 miR-124 与 DNMT3B 的 3' UTR 区结合。本文实验通过荧光素酶报告载体系统验证发现 DNMT3B 是 miR-124 直接调控的靶基因, 运用 Western blot 检测证实高表达 miR-124 可显著抑制 DNMT3B 蛋白的表达。提示 DNMT3B 是 miR-124 直

接调控的靶基因。说明 miR-124 可通过靶向调控 DNMT3B 表达抑制胃癌细胞生长增殖能力。这进一步揭示了 miR-124 在胃癌的抑瘤分子机制, 阐明 miR-124 在胃癌发生发展中的作用对于认识胃癌发生的机制, 探索新的有效的胃癌诊断预后评价标志物及治疗方法, 具有重要的科学意义<sup>[12]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Ghanta KS, Li DQ, Eswaran J, et al. Gene profiling of MTA1 identifies novel gene targets and functions [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e17135.
- [2] Wiltong SM, van Boerdonk RA, Henken FE, et al. Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of hsa-miR-124 in cervical cancer [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9(1): 167.
- [3] Furuta M, Kozaki KI, Tanaka S, et al. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(5): 766-776.
- [4] Li KK, Pang JC, Ching AK, et al. miR-124 is frequently down-regulated in medulloblastoma and is a negative regulator of SLC16A1 [J]. *Hum Pathol*, 2009, 40(9): 1234-1243.
- [5] Pierson J, Hostager B, Fan R, et al. Regulation of cyclin dependent kinase 6 by microRNA 124 in medulloblastoma [J]. *J Neurooncol*, 2008, 90(1): 1-7.
- [6] Hunt S, Jones AV, Hinsley EE, et al. MicroRNA-124 suppresses oral squamous cell carcinoma motility by targeting ITGB1 [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(1): 187-192.
- [7] Silber J, Lim DA, Petritsch C, et al. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells [J]. *BMC Med*, 2008, 6: 14.
- [8] 吕辉, 唐云云, 唐海林, 等. miR-124 在胃癌中的表达及其临床意义 [J]. *医学临床研究*, 2012, 29(3): 388-390.
- [9] 唐海林, 苏坚, 邓敏, 等. 胃癌组织中 miR-222 与 TIMP3 的表达及临床意义 [J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(4): 194-197.
- [10] 唐海林, 邓敏, 廖前进, 等. 结肠癌组织中 miR-185 的表达及其临床意义 [J]. *中南医学科学杂志*, 2011, 39(5): 112-114.
- [11] Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(40): 15805-15810.
- [12] 唐海林, 邓敏, 廖前进, 等. miR-23a 与转移抑制因子 1 在结肠癌中的表达及其临床意义 [J]. *中华病理学杂志*, 2012, 41(1): 28-32.