

# MicroRNA-431-5p在胃癌组织中低表达 基于线粒体和Bax/Bcl-2/caspase3信号通路

吴佳明, 邓忠权, 朱奕, 窦广健, 李进, 黄立勇

嘉兴市第一医院(嘉兴学院附属医院)胃肠外科, 浙江 嘉兴 314000

**摘要:**目的 探究microRNA-431-5p(miR-431-5p)在胃癌细胞的表达特点及其对胃癌细胞凋亡及线粒体功能的影响。方法 荧光定量PCR检测miR-431-5p在50例胃癌组织及癌旁组织中的表达,并分析其与患者临床病理特征的关系。采用脂质体转染技术构建miR-431-5p过表达组细胞(miRNA mimics)及对照组细胞(NC mimics),分别采用CCK-8、流式细胞术、荧光探针标记以及ATP检测试剂盒评估miR-431-5p对MKN-45细胞线粒体数量、膜电位完整性、通透性转换孔开放程度、活性氧生成水平以及ATP含量的影响,Western blot检测MKN-45细胞内凋亡蛋白表达水平的变化。结果 miR-431-5p在胃癌组织中的表达水平较癌旁组织明显下调( $P<0.001$ ),其表达水平与患者的肿瘤分化程度( $P=0.0227$ )、T分期( $P=0.0184$ )、N分期( $P=0.0005$ )、TNM分期( $P=0.0414$ )和血管侵犯( $P=0.0107$ )密切相关。细胞功能实验显示:过表达miR-431-5p抑制MKN-45细胞增殖能力并诱导细胞凋亡,miR-431-5p过表达后MKN-45细胞内线粒体数量减少、膜电位完整性下降、通透性转换孔开放程度增加,ROS生成增多,ATP含量降低。Western blot显示:miR-431-5p过表达后MKN-45细胞内抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调,而促凋亡蛋白p53、Bax以及cleaved caspase 3表达上调。结论 miR-431-5p低表达于胃癌组织,其可能通过介导Bax/Bcl-2/Caspase3信号通路,继而抑制胃癌细胞线粒体功能并促进细胞凋亡,是胃癌潜在的治疗靶点。

**关键词:**胃癌;细胞凋亡;线粒体功能;miRNA-431-5p

## Overexpression of miR-431-5p impairs mitochondrial function and induces apoptosis in gastric cancer cells via the Bax/Bcl-2/caspase3 pathway

WU Jiaming, DENG Zhongquan, ZHU Yi, DOU Guangjian, LI Jin, HUANG Liyong

Department of Gastrointestinal Surgery, First Hospital of Jiaxing (First Affiliated Hospital of Jiaxing University), Jiaxing 314000, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of microRNA miR-431-5p in gastric cancer (GC) tissues and its effects on apoptosis and mitochondrial function in GC cells. **Methods** The expression level of miR-431-5p in 50 clinical samples of GC tissues and paired adjacent tissues was detected using real-time fluorescence quantitative PCR, and its correlation with the clinicopathological features of the patients was analyzed. A cultured human GC cell line (MKN-45 cells) were transfected with a miR-431-5p mimic or a negative control sequence, and the cell proliferation, apoptosis, mitochondrial number, mitochondrial potential, mitochondrial permeability transition pore (mPTP), reactive oxygen species (ROS) production and adenosine triphosphate (ATP) content were detected using CCK-8 assay, flow cytometry, fluorescent probe label, or ATP detection kit. The changes in the expression levels of the apoptotic proteins in the cells were detected with Western blotting. **Results** The expression level of miR-431-5p was significantly lower in GC tissues than in the adjacent tissues ( $P<0.001$ ) and was significantly correlated with tumor differentiation ( $P=0.0227$ ), T stage ( $P=0.0184$ ), N stage ( $P=0.0005$ ), TNM stage ( $P=0.0414$ ) and vascular invasion ( $P=0.0107$ ). In MKN-45 cells, overexpression of miR-431-5p obviously inhibited cell proliferation and induced cell apoptosis, causing also mitochondrial function impairment as shown by reduced mitochondrial number, lowered mitochondrial potential, increased mPTP opening, increased ROS production and reduced ATP content. Overexpression of miR-431-5p significantly downregulated the expression of Bcl-2 and increased the expressions of pro-apoptotic proteins p53, Bcl-2 and cleaved caspase-3 protein. **Conclusion** The expression of miR-431-5p is down-regulated in GC, which results in mitochondrial function impairment and promotes cell apoptosis by activating the Bax/Bcl-2/caspase 3 signaling pathway, suggesting the potential role of miR-431-5p in targeted therapy for GC.

**Keywords:** gastric cancer; cell apoptosis; mitochondrial function; miRNA-431-5p

胃癌(GC)是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率、死亡率均位居恶性肿瘤前列,严重影响人类的健康状况<sup>[1-3]</sup>。近年来,胃癌的诊断、治疗技术取得巨大进展,早期患者5年生存率可达90%以上,但由于胃癌早期缺乏特异性临床表现,延误患者治疗时间,导致我国

进展期胃癌患者总体较差,其5年生存率仅为35.1%,而肿瘤转移是主要的死亡原因<sup>[4-6]</sup>。虽然近年来靶向治疗和免疫治疗的发展极大地延长了胃癌患者的生存期,但还是无法到达治愈的效果,且耐药现象愈发严重<sup>[7]</sup>。因此,仍需要从分子层面深入研究胃癌的发生发展机制,挖掘更多的治疗靶点,从而改善患者的生存预后。

miRNAs是一类长度为18~25 bp的非编码RNA,其已被证实能在多个层面调控肿瘤的增殖、侵袭转移以及细胞凋亡等生物学行为,影响肿瘤的发生发展<sup>[8-10]</sup>。

收稿日期:2022-12-25

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目-青年人才计划(2020RC121)

作者简介/通信作者:吴佳明,博士,副主任医师,E-mail: wujm1980

@outlook.com

细胞增殖异常是肿瘤细胞的主要特征之一,抑制细胞异常增殖并诱导细胞凋亡是治疗肿瘤的重要手段。本课题组前期研究发现microRNA-431-5p(miR-431-5p)受circRNA\_0005075负向调控,并通过p53、Bcl-2、Bax等下游基因影响胃癌细胞增殖、迁移及侵袭等生物学行为。基于该研究背景,我们推测miR-431-5p是胃癌细胞关键的抗癌基因,并可能通过诱导线粒体凋亡途径实现。因此,我们将进一步探索miR-431-5p调节胃癌细胞线粒体功能和细胞凋亡的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 组织标本

选取2019年7月~2021年4月在本院行胃癌根治术患者的癌组织及配对癌旁组织共50例。纳入标准:(1)经术后病理检查确诊为胃癌;(2)初次确诊,术前未接受过任何放化疗、靶向及免疫治疗等抗肿瘤治疗;(3)患者依从性好,临床资料完整。排除标准:(1)合并其他部位恶性肿瘤的患者;(2)合并严重心、肝、肾等重要脏器疾病者;(3)存在自身免疫系统疾病、精神类疾病、妊娠、哺乳等可能影响本研究结果的患者。本研究通过我院医学伦理委员会批准(LS2019-213)。

### 1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 实验试剂 DMEM高糖培养基、胎牛血清(Gibco),miR-431-5p mimics、NC mimics及引物序列(广州锐博公司),Lipo8000™转染试剂、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、线粒体通透性转换孔(mPTP)检测试剂盒、Mito-Tracker Red CMXRos(线粒体红色荧光探针)(上海碧云天公司),活性氧检测试剂盒(北京索莱宝公司),细胞凋亡试剂盒(日本同仁公司),TRIzol(Invitrogen),逆转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒(Takara),Bcl-2兔抗人多克隆抗体、p53兔抗人多克隆抗体、Bax兔抗人多克隆抗体、GAPDH鼠抗人单克隆抗体(Proteintech),Caspase 3兔抗人单克隆抗体、Cleaved caspase 3兔抗人单克隆抗体(CST)

1.2.2 实验仪器 激光共聚焦显微镜(Nikon)、流式细胞仪(BD)、LightCycler® 480 II System(Roche)、多功能酶标仪(Thermo)

### 1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)实验 使用TRIzol试剂提取组织或细胞总RNA,测定浓度后使用逆转录试剂盒合成cDNA,加入相应引物,以cDNA为模板,使用荧光定量PCR仪扩增处理并计算目的基因的相对表达水平。引物序列:miR-431-5p FORWARD 5'-CCA GGTCGTCTTG CAGG-3', REVERSE 5'-GTTGTTGG TTGGTTGGTTGT-3', U6 FORWARD 5'-AAAGCAA ATCATCGGACGACC-3', REVERSE 5'-GGGGTCGT

TGATGGCAACA-3'。

1.3.2 细胞培养和转染 人胃癌细胞系MKN-45采用DMEM高糖培养基,辅以10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养。

取对数生长期的MKN-45细胞消化后接种于六孔板,密度为5×10<sup>5</sup>/孔。当细胞生长至汇合度达70%~80%时,按照说明书将miR-431-5p mimics和NC mimics分别与Lipo8000™转染试剂混合后进行细胞转染,48h后收集细胞进行后续实验。根据转染物的不同,实验分组设置为miRNA mimics组和NC mimics组。

1.3.3 细胞增殖的检测 收集转染后的细胞接种于96孔板,分别在接种后1、2、3、4、5 d加入10 μL CCK-8试剂,37℃孵育2 h,使用多功能酶标仪测定各孔在450 nm波长下的吸光度,绘制生长曲线。

1.3.4 细胞凋亡的检测 收集转染后的细胞,按照细胞凋亡试剂盒说明,使用100 μL Annexin V-FITC结合液重悬细胞,加入5 μL Annexin V-FITC,5 μL PI染色液,混匀后室温孵育15 min,流式细胞仪上机检测。

1.3.5 细胞内线粒体数量的检测 细胞转染后的细胞,弃去细胞培养基,加入Mito-Tracker Red CMXRos染料(200 nmol),37℃孵育15 min,细胞固定通透后加入含DAPI的抗荧光淬灭封片液,激光共聚焦显微镜下观察细胞内的荧光强度。

1.3.6 细胞内活性氧生成水平的检测 细胞转染后的细胞,弃去细胞培养基,加入DHE红色荧光染料(10 μmol),37℃避光孵育30 min,加入含DAPI的抗荧光淬灭封片液,激光共聚焦显微镜下观察细胞内的荧光强度。

1.3.7 细胞内线粒体膜电位的检测 细胞转染后的细胞,弃去细胞培养基,加入JC-1染色工作液,37℃避光孵育20 min,JC-1染色缓冲液洗涤细胞2次,激光共聚焦显微镜下观察细胞内的荧光强度。

1.3.8 细胞内线粒体通透性转换孔的检测 细胞转染后的细胞,弃去细胞培养基,加入Calcein AM染色液,37℃避光孵育30 min,加入含DAPI的抗荧光淬灭封片液,激光共聚焦显微镜下观察细胞内的荧光强度。

1.3.9 细胞内ATP含量的检测 收集转染后的细胞,按照ATP检测试剂盒说明,加入ATP检测裂解液裂解细胞,配制ATP检测工作液,分别加入ATP标准溶液和细胞裂解液,利用标准曲线计算细胞内ATP的含量。

1.3.10 细胞内凋亡蛋白的检测 收集转染后的细胞,使用RIPA总蛋白裂解液提取蛋白,BCA定量法测定蛋白浓度,蛋白经10% SDS-PAGE胶分离后转移至PVDF膜,5% BSA进行封闭,与Bcl-2(1:5000)、p53(1:5000)、Bax(1:2000)、Caspase 3(1:1000)、Cleaved caspase 3(1:1000)、GAPDH(1:100 000)等一抗置于4℃孵育过夜,次日洗膜(3次,10 min),然后室温二抗孵育2 h,再

次洗膜(3次, 10 min), 最后进行曝光。

1.3.10 统计学分析 采用 GraphPad Prism 9 进行统计学分析。计量资料以均数±标准差表示, 组间比较采用 *t* 检验或单因素方差分析。以 miR-431-5p 在 50 例胃癌组织中的相对表达量( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )的中位数为阈值将所有病例分为高表达组(大于中位数)及低表达组(小于中位数), 采用  $\chi^2$  检验分析 miR-431-5p 在胃癌组织中的表达水平与临床病理特征的相关性。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-431-5p 在胃癌组织中的表达特点及临床意义

胃癌组织中的 miR-431-5p 表达水平相对于癌旁组织明显降低, 两组比较有显著性差异 ( $P < 0.001$ , 图 1)。miR-431-5p 在胃癌组织中的表达水平与患者的肿瘤分化程度 ( $P = 0.0227$ )、T 分期 ( $P = 0.0184$ )、N 分期 ( $P = 0.0005$ )、TNM 分期 ( $P = 0.0414$ ) 和血管侵犯 ( $P = 0.0107$ ) 密切相关(表 1)。

### 2.2 miR-431-5p 过表达胃癌细胞的建立

RT-qPCR 结果显示, miRNA mimics 组 MKN-45 细胞内 miR-431-5p 相对表达水平明显上调, 与 NC mimics 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ , 图 2)。

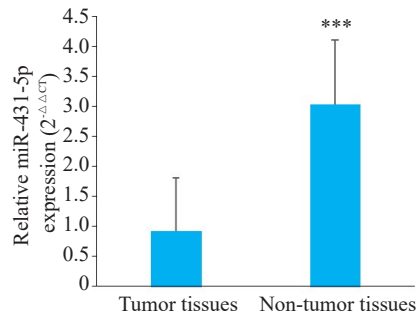


图 1 miR-431-5p 在胃癌组织及癌旁组织中的表达水平  
Fig.1 Expression of miR-431-5p in gastric tissues and adjacent tissues. \*\*\* $P < 0.001$  vs tumor tissues.

### 2.3 miR-431-5p 对胃癌细胞增殖及凋亡的影响

CCK-8 实验显示, miRNA mimics 组 MKN-45 细胞的生长速度明显下降, 与 NC mimics 组细胞比较差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ , 图 3)。流式细胞仪结果显示, miRNA mimics 组 MKN-45 细胞的总凋亡率明显增加, 与 NC mimics 组细胞比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 4)。

### 2.4 miR-431-5p 对胃癌细胞线粒体功能的影响

miRNA mimics 组 MKN-45 细胞内线粒体的数量相比 NC mimics 组明显减少, 两组细胞荧光强度比较差

表 1 miR-431-5p 的表达水平和胃癌患者临床病理特征的关系

Tab.1 Correlation between miR-431-5p expression and clinicopathological features of patients with gastric cancer

| Clinicopathological features | n  | miR-431-5p expression |      | $\chi^2$ | P      |
|------------------------------|----|-----------------------|------|----------|--------|
|                              |    | Low                   | High |          |        |
| Age (years)                  |    |                       |      |          |        |
| <60                          | 33 | 16                    | 17   | 0.089    | 0.7653 |
| ≥60                          | 17 | 9                     | 8    |          |        |
| Gender                       |    |                       |      |          |        |
| Male                         | 30 | 18                    | 12   | 3.000    | 0.0833 |
| Female                       | 20 | 7                     | 13   |          |        |
| Tumor differentiation        |    |                       |      |          |        |
| Moderate/Well                | 22 | 7                     | 15   | 5.195    | 0.0227 |
| Undifferentiated /Poor       | 28 | 18                    | 10   |          |        |
| T stage                      |    |                       |      |          |        |
| T1                           | 18 | 5                     | 13   | 5.556    | 0.0184 |
| T2-T4                        | 32 | 20                    | 12   |          |        |
| N stage                      |    |                       |      |          |        |
| N0                           | 20 | 4                     | 16   | 12.000   | 0.0005 |
| N1-N3                        | 30 | 21                    | 9    |          |        |
| TNM stage                    |    |                       |      |          |        |
| I+II                         | 31 | 12                    | 19   | 4.160    | 0.0414 |
| III+IV                       | 19 | 13                    | 6    |          |        |
| Nerve invasion               |    |                       |      |          |        |
| Negative                     | 11 | 6                     | 5    | 0.1166   | 0.7328 |
| Positive                     | 39 | 19                    | 20   |          |        |
| Vascular invasion            |    |                       |      |          |        |
| Negative                     | 27 | 9                     | 18   | 6.522    | 0.0107 |
| Positive                     | 23 | 16                    | 7    |          |        |



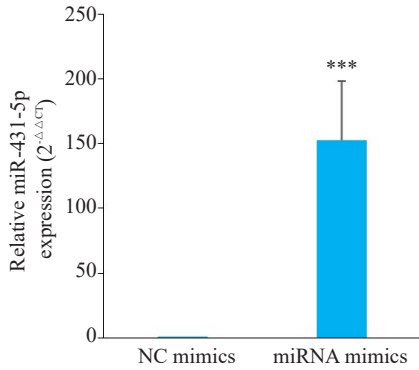


图2 miR-431-5p在MKN-45细胞中的表达水平  
Fig.2 Expression of miR-431-5p in MKN-45 cells transfected with miR-431-5p mimic or a NC mimic. \*\*\* $P < 0.001$  vs NC mimics.

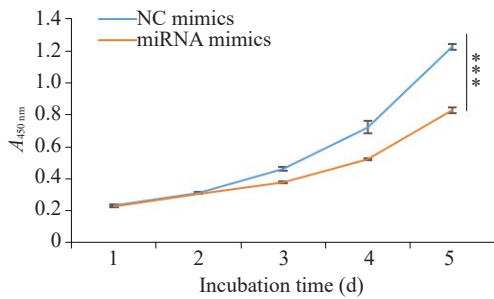


图3 miR-431-5p对MKN-45细胞增殖特性的影响  
Fig.3 Effect of miR-431-5p on cell proliferation in MKN-45 cells (\*\*\*) $P < 0.001$ .

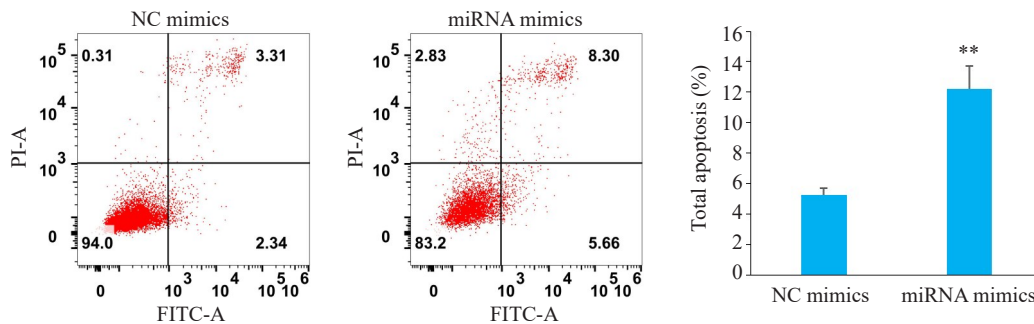


图4 miR-431-5p对MKN-45细胞总凋亡率的影响  
Fig.4 Effect of miR-431-5p overexpression on apoptosis in MKN-45 cells. \*\* $P < 0.01$  vs NC mimics.

### 3 讨论

编码基因一直是生物学领域的研究热点,通常人体内95%以上的编码基因可被转录为非编码RNA,后者是一类不参与蛋白质编码的RNA,在转录水平就可发挥生物学作用<sup>[11]</sup>。miRNA是一种内源性非编码小RNA,能在转录后水平上靶向调控下游mRNA,参与调节人体细胞分化、生长和凋亡等生物学过程<sup>[8]</sup>。研究表明,某些miRNA可以充当促癌基因或抑癌基因,参与胃癌的生长、侵袭、转移或者耐药,与胃癌患者预后密切相关<sup>[12,13]</sup>。miR-431-5p作为一种保守型非编码RNA,已

具有统计学意义( $P < 0.01$ ,图5A)。

miRNA mimics组MKN-45细胞内红色荧光相比NC mimics组减弱,而绿色荧光增强,两组细胞红色和绿色荧光相对值比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ ,图5B)。

采用Calcein AM荧光探针检测线粒体通透性转换孔(mPTP)开放程度,结果显示,miRNA mimics组MKN-45细胞内绿色荧光相比NC mimics组细胞明显减弱,两组的荧光值比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ ,图5C)。

#### 2.6 miR-431-5p对胃癌细胞活性氧(ROS)水平的影响

采用DHE荧光探针检测ROS含量,结果显示,miRNA mimics组MKN-45细胞内红色荧光相比NC mimics组细胞明显增强,两组的荧光值比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ ,图6)。

#### 2.7 miR-431-5p对胃癌细胞ATP生成水平的影响

ATP能量生成检测结果显示,miRNA mimics组细胞ATP生成水平明显下降,与NC mimics组细胞比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ ,图7)。

#### 2.8 miR-431-5p对胃癌细胞凋亡相关蛋白的影响

Western blot结果显示,与NC mimics组MKN-45细胞相比,miRNA mimics组细胞内抗凋亡蛋白Bcl-2表达下调( $P < 0.001$ ),而促凋亡蛋白p53、Bax、caspase 3以及Cleaved caspase 3表达上调( $P < 0.05$ 或 $P < 0.001$ ,图8)。

被证实在不同肿瘤中涉及一系列生物学过程。既往研究显示,miR-431-5p在肝癌组织和细胞系中呈低表达,其过表达可通过靶向调控URO28基因抑制肝癌细胞的增殖、侵袭及EMT进程<sup>[14]</sup>。与该研究类似,乳头状甲状腺癌、胰腺癌、胃癌中miR-431-5p同样也表达降低,过表达miR-431-5p可抑制肿瘤进展<sup>[15-19]</sup>。基于50对胃癌组织和癌旁组织标本及相应的临床数据,本研究检测分析了miR-431-5p在胃癌组织中的表达特点,结果显示:胃癌组织显著低表达miR-431-5p,其表达水平与胃癌患者T分期、N分期、TNM分期、血管侵犯以及肿瘤分

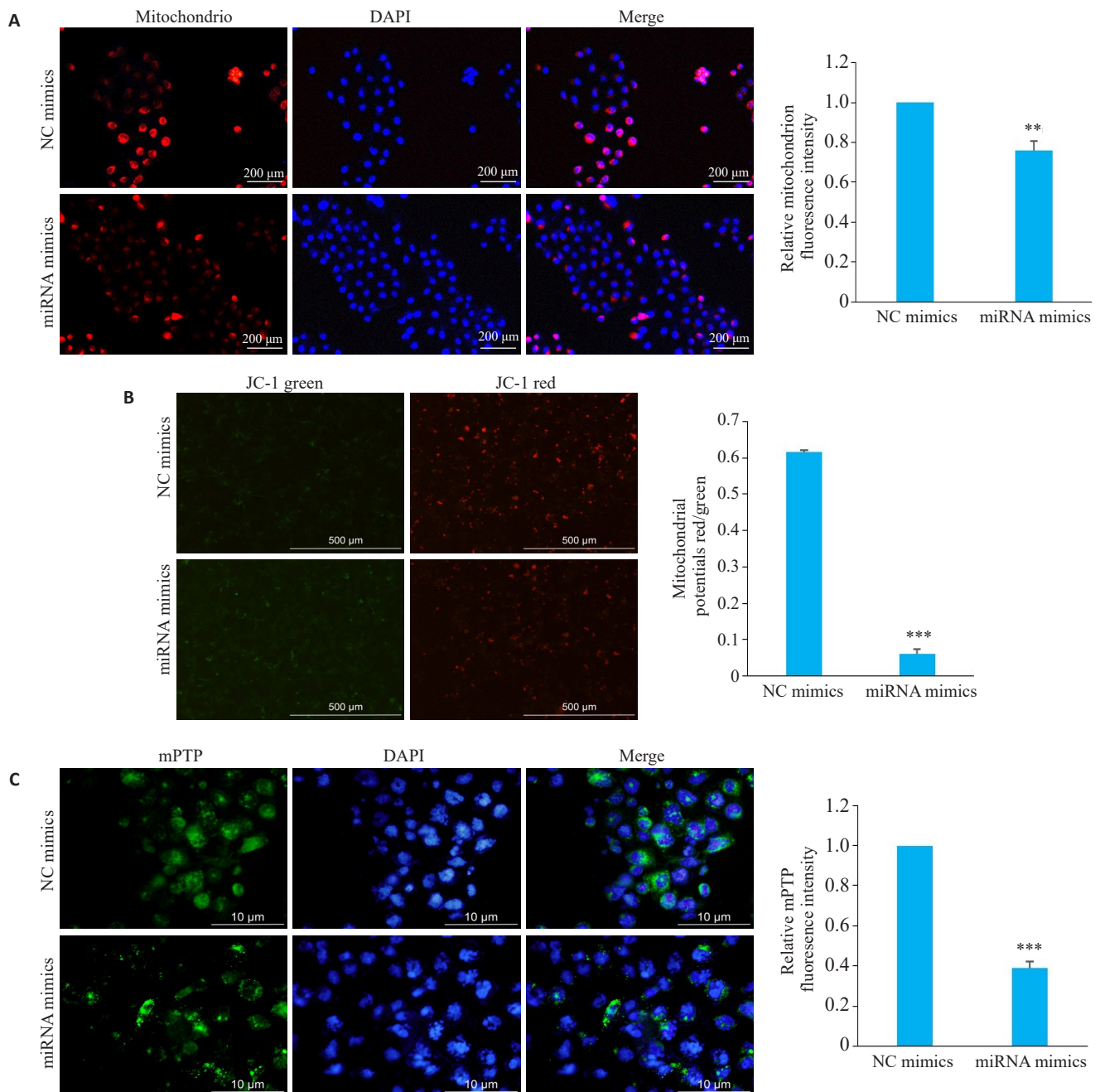


图5 miR-431-5p对MKN-45细胞线粒体功能的影响

Fig.5 Effect of miR-431-5p overexpression on mitochondrial functions in MKN-45 cells. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs NC mimic. A: Mitochondrial number. B: Mitochondrial potential. C: Mitochondrial mPTP.

化程度有关,说明miR-431-5p表达下调提示胃癌患者的疾病进展,是潜在的抑癌基因。

本研究的体外实验显示,过表达miR-431-5p后MKN-45胃癌增殖活力下降、总凋亡率增加,说明miR-431-5p可能通过诱导细胞凋亡降低胃癌细胞的生长能力,其促凋亡作用亦可见于胰腺癌和白血病<sup>[16, 19, 20]</sup>。除此之外,本课题组既往研究证实miR-431-5p表达下调可以逆转circRNA\_0005075 siRNA对p53、Bcl-2、Bax等的调控作用并影响胃癌细胞增殖、迁移及侵袭特性<sup>[21]</sup>。虽然该研究并未表明miR-431-5p过表达后所引起的生物学作用,但是提示了miR-431-5p对细胞凋亡

的正向调控作用。p53蛋白是人体细胞内重要的肿瘤抑制因子,当细胞处于致癌基因过表达或某些化学、物理刺激作用下,p53蛋白会被激活并诱导细胞凋亡来杀死异常细胞<sup>[22, 23]</sup>。值得注意的是,线粒体在细胞凋亡中起着核心调控的作用,可作为潜在的抗肿瘤途径,而p53蛋白已被证实能够通过激活线粒体介导的细胞凋亡而抑制肿瘤生长<sup>[24-26]</sup>。因此,我们认为miR-431-5p发挥抗肿瘤作用与线粒体凋亡途径密切相关。

本研究继续对miR-431-5p和线粒体凋亡途径的关系进行深入探索。首先,本研究检测了胃癌细胞内线粒体的荧光信号,结果显示过表达miR-431-5p可以减少

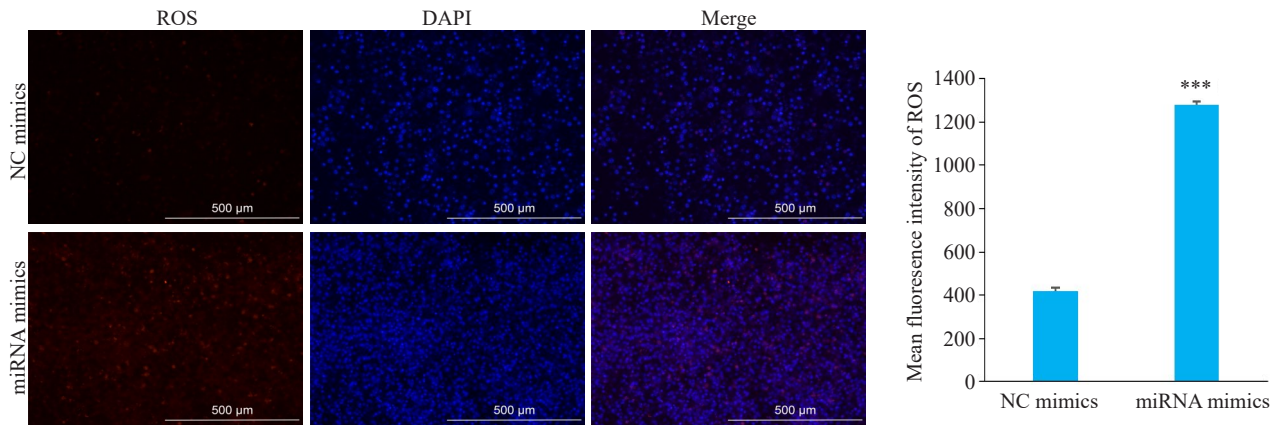


图6 miR-431-5p对MKN-45细胞ROS生成水平的影响

Fig.6 Effect of miR-431-5p overexpression on ROS production in MKN-45 cells. \*\*\* $P < 0.001$  vs NC mimics.

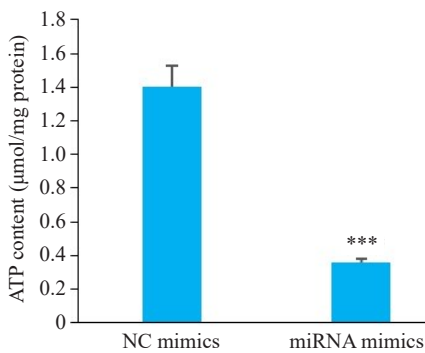


图7 miR-431-5p对MKN-45细胞ATP含量的影响

Fig.7 Effect of miR-431-5p overexpression on ATP levels in MKN-45 cells. \*\*\* $P < 0.001$  vs NC mimics.

胃癌细胞的线粒体数量,并可能引起线粒体功能障碍。正常线粒体膜电位可以调控线粒体内膜对外界物质的选择性和通透性,从而维持线粒体的正常结构与功能。当细胞受到外界因素的刺激,线粒体膜电位下降,导致线粒体膜通透性转运通道开放,大量凋亡因子从线粒体释放到细胞质中,最终加速细胞死亡<sup>[25, 27, 28]</sup>。本研究分别采用JC-1、Calcein AM荧光探针检测线粒体膜电位的高低以及通透性转换孔的开放程度,结果显示miR-431-5p过表达后胃癌细胞内红绿荧光强度的相对值减少,而线粒体通透性转换孔荧光强度增加,反映了miR-431-5p能够改变胃癌细胞线粒体正常膜电位,导致膜通

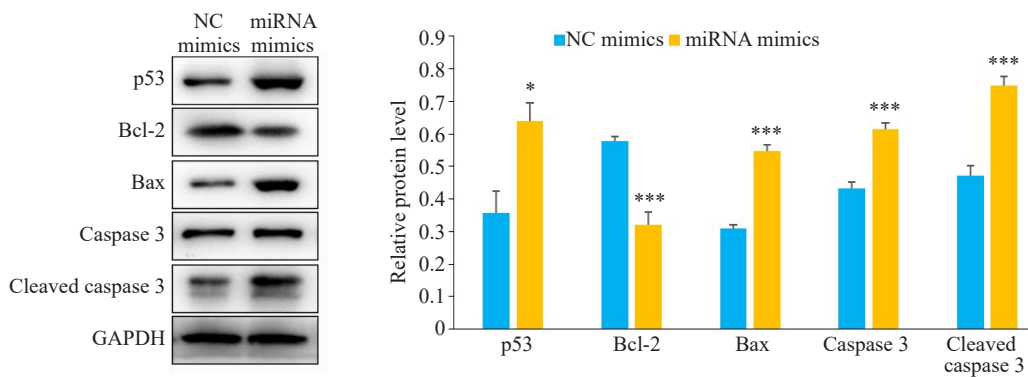


图8 miR-431-5p对MKN-45细胞内凋亡蛋白的影响

Fig.8 Effect of miR-431-5p overexpression on expressions of apoptotic proteins in MKN-45 cells. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs NC mimics.

透性转运通道开放,影响线粒体功能,此作用可能是miR-431-5p诱导细胞凋亡的机制。此外,本研究还发现,过表达miR-431-5p后胃癌细胞内ROS含量上升,而ATP生成水平下降。既往有研究显示,ROS和线粒体膜电位之间的相互作用影响线粒体的功能。ROS增多时,线粒体膜可受到损害,使膜电位降低,从而影响跨越线粒体膜的质子梯度,使线粒体的ATP合成功能下降。线粒体功能受损反过来导致ROS产生增多,过多的ROS

不能及时被清除,其含量进一步增加,最终加重细胞凋亡<sup>[29-31]</sup>。Bax/Bcl-2/caspase 3信号通路与线粒体凋亡途径密切相关,Bax过表达能够抑制Bcl-2的表达,并能激活caspase 3,而caspase 3作为细胞凋亡的关键执行者,在线粒体凋亡途径中受凋亡信号的基础上,其上游信号分子作用于线粒体膜,线粒体通透性发生改变,最终引发级联反应促进细胞凋亡<sup>[32, 33]</sup>。其中,Cleaved caspase 3是caspase 3的活性形式,是促进细胞凋亡的主要裂解



酶。本研究结果显示,miR-431-5p过表达组细胞Bax、Cleaved caspase 3表达水平高于其对照组,Bcl-2蛋白表达水平低于其对照组,表明miR-431-5p可促进胃癌MKN-45细胞中Bax、Cleaved caspase 3蛋白表达,抑制Bcl-2蛋白表达。上述结果表明,miR-431-5p诱导的胃癌细胞凋亡与线粒体功能的损伤和Bax/Bcl-2/caspase3信号通路的激活相关。

综上所述,本研究证实miR-431-5p在胃癌发生发展过程中呈低表达状态,其表达水平与胃癌患者疾病进展的密切相关,是潜在的抑癌基因。通过本研究也发现miR-431-5p在线粒体功能障碍诱导的凋亡途径中具有很重要的调控作用,其促凋亡作用可能通过Bax/Bcl-2/caspase3信号通路介导,阐明其中的分子机制有助于开发以miR-431-5p和线粒体为靶点的新型抗肿瘤策略。

### 参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] Morgan E, Arnold M, Camargo MC, et al. The Current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020-40: a population-based modelling study [J]. *EClinicalMedicine*, 2022, 47: 101404.
- [3] Chen W, Sun K, Zheng R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(1): 1-12.
- [4] 曹毛毛,李贺,孙殿钦,等. 2000—2019年中国胃癌流行病学趋势分析[J]. *中华消化外科杂志*, 2021, 20(1): 102-9.
- [5] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(1): 19-28.
- [6] Zeng H, Chen W, Zheng R, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries [J]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6(5): e555-67.
- [7] Haque E, Esmail A, Muhsen I, et al. Recent trends and advancements in the diagnosis and management of gastric cancer [J]. *Cancers: Basel*, 2022, 14(22): 5615.
- [8] Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer [J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14(4): dmm047662.
- [9] Shah V, Shah J. Recent trends in targeting miRNAs for cancer therapy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72(12): 1732-49.
- [10] Shiah SG, Chou ST, Chang JY. microRNAs: their role in metabolism, tumor microenvironment, and therapeutic implications in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancers: Basel*, 2021, 13(22): 5604.
- [11] Chen L, Deng J. Role of non-coding RNA in immune microenvironment and anticancer therapy of gastric cancer [J]. *J Mol Med: Berl*, 2022, 100(12): 1703-19.
- [12] Hu ML, Xiong SW, Zhu SX, et al. microRNAs in gastric cancer: from bench to bedside [J]. *Neoplasma*, 2019, 66(2): 176-86.
- [13] Nacula L, Matei L, Dragu D, et al. Recent advances in gastric cancer early diagnosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(17): 2029-44.
- [14] Kong QL, Han JH, Deng H, et al. miR-431-5p alters the epithelial-to-mesenchymal transition markers by targeting UROC28 in hepatoma cells [J]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11: 6489-503.
- [15] Liu Y, Li L, Liu Z, et al. Downregulation of miR-431 expression associated with lymph node metastasis and promotes cell invasion in papillary thyroid carcinoma [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 22(4): 727-32.
- [16] Yang J, Zhu H, Jin Y, et al. miR-431 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis by targeting CDK14 in pancreatic cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(14): 4493-9.
- [17] Haugen ØP, Khuu C, Weidemann HM, et al. Transcriptomic and functional studies reveal miR-431-5p as a tumour suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma cells [J]. *Gene*, 2022, 822: 146346.
- [18] 陈和萍,韩钧凌,俞力军,等. LINC00680靶向miR-431-5p调控胃癌细胞增殖、上皮间充质转化、迁移和侵袭 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(20): 2492-7.
- [19] 汪俊州,王义刚,孙雅轩. miR-431-5p通过调控AKT1抑制胰腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和促进凋亡研究 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2022, 47(6): 716-21.
- [20] 朱平,廖欣,梁欣泉,等. miR-431-5p抑制MDM2表达影响白血病细胞增殖、凋亡的机制研究 [J]. *南昌大学学报: 医学版*, 2020, 60(4): 74-80.
- [21] Wu J, Chen Z, Song Y, et al. CircRNA\_0005075 suppresses carcinogenesis via regulating miR-431/p53/epithelial-mesenchymal transition axis in gastric cancer [J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(7): 932-42.
- [22] Duffy MJ, Synnott NC, O'Grady S, et al. Targeting p53 for the treatment of cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 79: 58-67.
- [23] Kwan K, Castro-Sandoval O, Gaiddon C, et al. Inhibition of p53 protein aggregation as a cancer treatment strategy [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2023, 72: 102230.
- [24] Carlsson MJ, Vollmer AS, Demuth P, et al. p53 triggers mitochondrial apoptosis following DNA damage-dependent replication stress by the hepatotoxin methyleugenol [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(11): 1009.
- [25] Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(2): 85-100.
- [26] Hao Q, Chen J, Liao J, et al. p53 induces ARTS to promote mitochondrial apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(2): 204.
- [27] Luo Y, Ma J, Lu W. The significance of mitochondrial dysfunction in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): E5598.
- [28] Chen H, Pei L, Xie P, et al. Circ-PRKDC contributes to 5-fluorouracil resistance of colorectal cancer cells by regulating miR-375/FOXO1 axis and Wnt/β-catenin pathway [J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13: 5939-53.
- [29] Heinke L. Mitochondrial ROS drive cell cycle progression [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(9): 581.
- [30] Zhang B, Pan C, Feng C, et al. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation [J]. *Redox Rep*, 2022, 27(1): 45-52.
- [31] Ramzan R, Dolga AM, Michels S, et al. Cytochrome c oxidase inhibition by ATP decreases mitochondrial ROS production [J]. *Cells*, 2022, 11(6): 992.
- [32] Lin KN, Zhao W, Huang SY, et al. Grape seed proanthocyanidin extract induces apoptosis of HL-60/ADR cells via the Bax/Bcl-2 caspase-3/9 signaling pathway [J]. *Transl Cancer Res*, 2021, 10(9): 3939-47.
- [33] Luo Y, Fu X, Ru R, et al. CpG oligodeoxynucleotides induces apoptosis of human bladder cancer cells via caspase-3-bax/bcl-2-p53 axis [J]. *Arch Med Res*, 2020, 51(3): 233-44.