

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.07.008

文章编号: 1005-8982 (2019) 07-0039-04

MicroRNA-134 对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响

植创¹, 李明星¹, 罗会芳²

(西南医科大学附属医院 1. 超声科, 2. 妇产科, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 探讨人宫颈癌组织中 microRNA-134 (miR-134) 的表达及对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法** PCR 法检测宫颈癌组织中 miR-134 表达水平; 在 HeLa 细胞内过表达 miR-134, 通过平板克隆形成试验检测细胞增殖, 通过流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡; PCR 及 Western blotting 检测 miR-134 潜在靶点 CCND1 表达变化。**结果** 宫颈癌组织中 miR-134 的表达水平较正常宫颈黏膜组织低 ($P < 0.05$); 过表达 miR-134 能够抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖 ($P < 0.05$)、阻滞细胞周期进展 ($P < 0.05$), 并促进细胞凋亡 ($P < 0.05$); 过表达 miR-134 后抑制 HeLa 细胞中 CCND1 mRNA 及蛋白的表达水平 ($P < 0.05$)。**结论** 宫颈癌组织中 miR-134 表达水平降低, 过表达 miR-134 能下调 CCND1 的表达发挥抗癌细胞生长作用。

关键词: 宫颈肿瘤; 微 RNAs (MicroRNAs); 细胞; 增殖; CCND1

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Role of MicroRNA-134 in proliferation capability of ovarian cancer

Chuang Zhi¹, Ming-xing Li¹, Hui-fang Luo²

(1. Department of Ultrasound, 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the role of MicroRNA-134 on proliferation and apoptosis of ovarian cancer. **Methods** The expression of MicroRNA-134 in ovarian cancer was measured by PCR. Clone formation assay and flow cytometry were performed to detect cell proliferation, cell cycle and apoptosis. PCR and Western blots were utilized for measurement of CCND1. **Results** MicroRNA-134 expression was down-regulated in ovarian cancer tissues ($P < 0.05$). Up-regulation of MicroRNA-134 inhibited cellular proliferation ($P < 0.05$), arrested cell cycle ($P < 0.05$), and enhanced apoptosis ($P < 0.05$) in HeLa cells. The expression of CCND1 was impaired along with overexpression of MicroRNA-134 in vitro ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of MicroRNA-134 is down-regulated in ovarian cancer tissues. Up-regulation of MicroRNA-134 inhibits ovarian tumor growth potentially through inhibiting CCND1.

Keywords: uterine cervical neoplasms; MicroRNAs; cell; proliferation; CCND1

宫颈癌是我国近年来发病率较高的女性生殖系统肿瘤之一^[1]。宫颈癌患者早期多以下腹隐痛、阴道流血及体重减轻等亚临床表现为主, 大多数患者就诊时的临床分期已较晚而失去行根治性手术的机会。因

而研究调节宫颈癌细胞生长的分子指标对提高宫颈癌患者手术切除率及改善患者长期预后具有重要作用。

MicroRNA (简称 miRNA) 是一类短的、单链 RNA, 其长度分布于 18 ~ 25 个碱基之间^[2]。在宫颈癌中已

收稿日期: 2018-10-25

[通信作者] 李明星, E-mail: lmx526@sina.com

发现许多与肿瘤细胞增殖转移^[3]及肿瘤血管新生^[4]密切相关的 miRNA。MicroRNA-134 (miR-134) 是近年来新鉴定的出一种 miRNA, 在包括子宫内膜癌^[5]及乳腺癌^[6]在内的多种女性生殖系统肿瘤中表达下调, 但其在宫颈癌中的表达及生物学意义尚未可知。

本课题拟通过检测 miR-134 在宫颈癌中的表达情况, 探究上调 miR-134 基因表达在体外对宫颈癌细胞增殖、细胞周期及细胞凋亡水平的影响, 旨在为研究 miR-134 在宫颈癌发生、发展中的作用提供一定的实验依据。

1 资料与方法

1.1 组织标本

选取 2014 年 1 月—2016 年 12 月于西南医科大学附属医院妇产科收治并行手术切除的 50 例宫颈癌组织及对应癌旁组织 (距肿瘤边缘距离 >2 cm) 标本。所有标本于离体 0.5 h 内取材, 于液氮中固定保存。

1.2 细胞来源及主要试剂

HeLa 细胞由超声科实验室保存, miR-134 慢病毒及阴性对照慢病毒均购自广州复能基因公司, miR-134 及 U6 引物购自广州锐博生物科技有限公司, DMEM 培养基及胎牛血清均购自美国 Gibco 公司, Trizol 试剂、RT-PCR 试剂盒 (Super Script[®] One-Step RT-PCR System with Platinum × Taq DNA Polymerase, 10928042) 及实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 试剂盒 (DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit, F415L) 均购自美国 Invitrogen 公司, 细胞周期检测试剂盒 (KGA512) 购自南京凯基生物, Annexin-V/PI 凋亡检测试剂盒 (FITC/PI 双染法, E606336) 购自生工生物工程 (上海) 有限公司, 兔抗人 CCND1 多克隆抗体 (AB134175)、 β -actin 单克隆抗体 (AB8226) 均购自美国 Abcam 公司。

1.3 qRT-PCR 检测 miR-134 及 CCND1 mRNA 表达

通过 Trizol 试剂提取标本及细胞 RNA, 配制逆转录及 PCR 扩增体系。设置逆转录条件: 50℃ 逆转录 30 min, 94℃ 灭活 2 min, 循环次数 1; 94℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 3 min, 循环次数 40; 72℃ 最终延伸 10 min。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-134 及 CCND1 mRNA 的相对含量。

1.4 细胞培养及慢病毒转导

在适宜条件下培养 HeLa 细胞至稳定传代, 将

HeLa 细胞过夜生长至融合度达 70% 密度接种 6 孔细胞培养板。达到预定培养密度后移除培养基, 1 × 磷酸盐缓冲液充分洗涤细胞。慢病毒感染分组: miR-134 组每孔加入 1 ml 的 miR-134 慢病毒上清液、2 ml 完全培养基及 15 μ g 聚凝胺; 对照组 (miR-con 组) 每孔加入 1 ml 的阴性对照慢病毒上清液、2 ml 完全培养基及 15 μ g 聚凝胺。转染 48 h 后, 使用含 2 μ g/ml 嘌呤霉素的完全培养液筛选稳定转染细胞株。

1.5 平板克隆形成试验

基因重组 HeLa 细胞按 500 个 / 孔均匀接种于 6 孔板中, 每周更换完全培养基 2 次。培养 2 周后, 使用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 1% 结晶紫染色 15 min, 置于蒸馏水中洗去多余染液。风干后将 6 孔板置于网格纸上计数每孔克隆形成数量, 计算克隆形成率。每个样本独立重复实验 3 次。

1.6 流式细胞仪分析 HeLa 细胞凋亡

HeLa 细胞用预冷 PBS 工作液冲洗 2 次, 胰酶消化细胞后用 1 500 r/min 离心 5 min 沉淀细胞, 预制缓冲液调整细胞数为 1×10^6 个 / ml。将 500 μ l 细胞悬液与 10 μ l 碘化丙啶 (PI) 溶液混合检测细胞周期; 与 5 μ l Annexin V-FITC 及 10 μ l PI 混合检测细胞凋亡。室温遮光反应 10 min 后上机测试。

1.7 Western blotting 检测 CCND1 蛋白表达

RIPA 试剂提取细胞总蛋白, 垂直电泳分离蛋白后 70 V 恒压转膜 120 min 固定蛋白, 5% 的牛白蛋白室温封闭 1 h; 用 3% 浓度的脱脂奶粉溶液按 1 : 1 000 比例稀释 CCND1 及 β -actin 抗体。在 4℃ 下孵育相应条带过夜。洗去残余一抗后采用 1 : 5 000 稀释的 HRP 标记山羊抗兔或抗鼠二抗室温孵育条带 1 h。于暗室内 ECL 法发光观察蛋白表达。每个样本独立重复实验 3 次。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-134 在宫颈癌组织中的表达情况

miR-134 在宫颈癌组织中的表达水平为 (0.596 \pm 0.089), 而癌旁组织为 (1.488 \pm 0.113), 两者比较差异有统计学意义 ($t = 2.413, P = 0.039$), 宫颈癌组织中

miR-134 的表达水平较癌旁组织低。

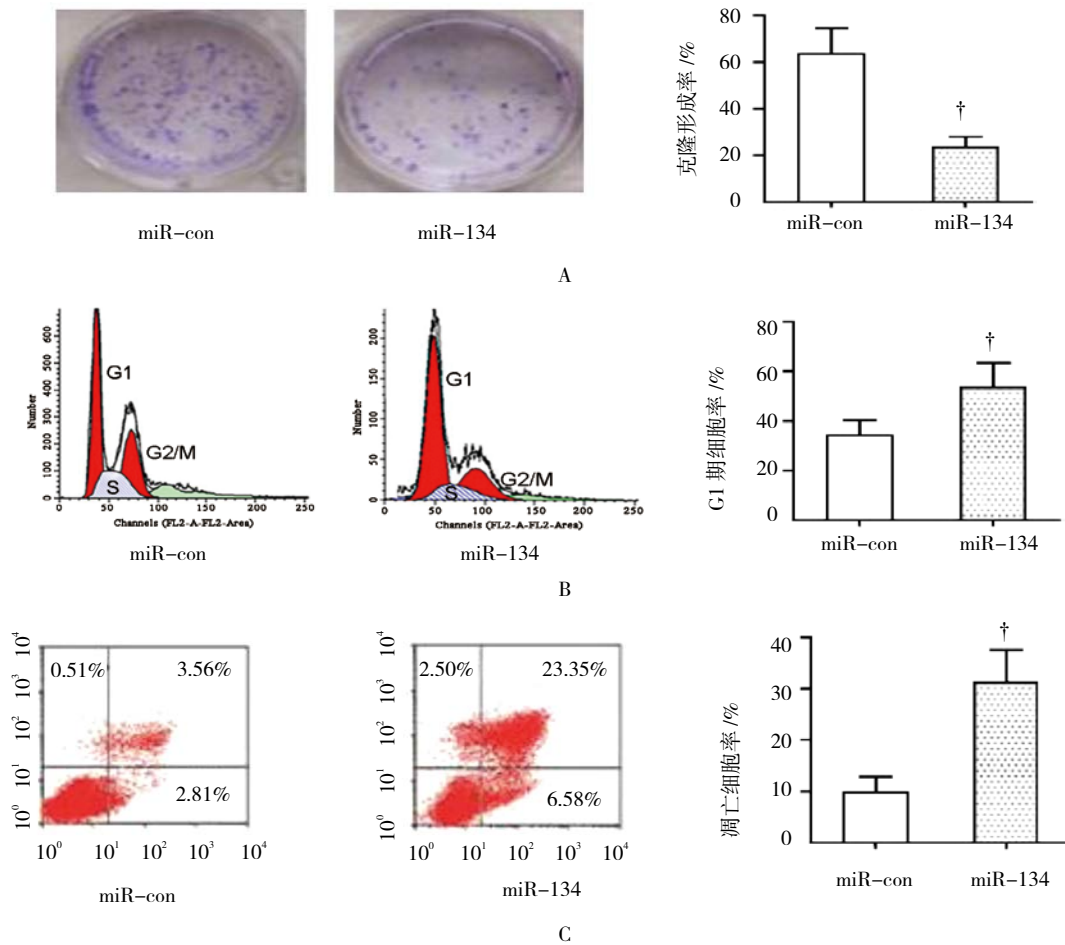
2.2 miR-134 对 HeLa 细胞增殖、细胞周期及细胞凋亡的影响

miR-134 慢病毒升高 HeLa 细胞中 miR-134 的表达水平 ($t=8.031, P=0.000$)。过表达 miR-134 下调 HeLa 细胞的克隆形成能力 ($t=3.178, P=0.027$) (见图 1A)。与 miR-con 组比较, 过表达 miR-134 后, miR-134 组 HeLa 细胞被阻滞于 G1 期 ($t=3.386, P=0.014$) (见图 1B), 并且细胞凋亡增多 ($t=4.223, P=0.008$) (见

图 1C)。

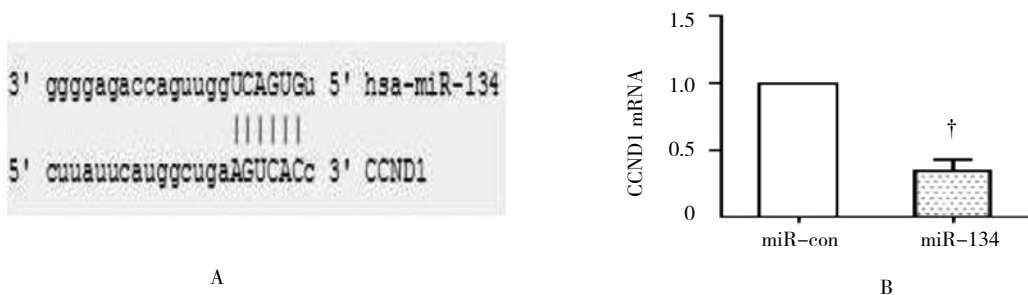
2.3 miR-134 对 HeLa 细胞中 CCND1 表达的影响

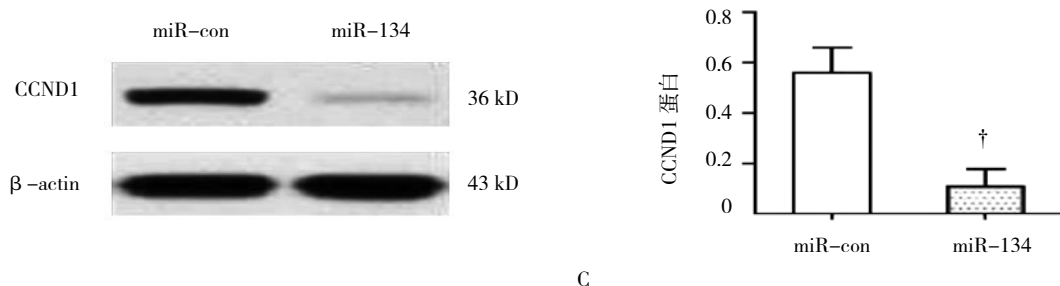
miR-con 组 HeLa 细胞内 CCND1 mRNA 及蛋白表达水平分别为 (1.00 ± 0.10) 及 (0.61 ± 0.08), 表达 miR-134 的 HeLa 细胞内 CCND1 mRNA 及蛋白表达水平分别为 (0.44 ± 0.07) 及 (0.15 ± 0.03); 与 miR-con 组比较, 过表达 miR-134 的 HeLa 细胞内 CCND1 mRNA ($t=4.531, P=0.007$) 及蛋白 ($t=2.808, P=0.039$) 水平均降低。见图 2。



A: 过表达 miR-134 对 HeLa 细胞增殖的影响; B: 过表达 miR-134 对 HeLa 细胞周期进展的影响; C: 过表达 miR-134 对 HeLa 细胞凋亡的影响。[†] 与 miR-con 组比较, $P < 0.05$

图 1 过表达 miR-134 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、细胞周期及凋亡的影响





A: miR-134 与 CCND1 mRNA 3'-UTR 结合位点; B: CCND1 mRNA 表达水平; C: CCND1 蛋白表达水平。† 与 miR-con 组比较, $P < 0.05$

图 2 miR-134 对 HeLa 细胞内 CCND1 表达的影响

3 讨论

miR-134 位于人类染色体 14q32 miRNA 集簇域上。生理学研究发现, miR-134 具有调节海马神经元树突棘发育、增强海马记忆和突触可塑性的功能^[7]。病理学上, miR-134 具有保护癫痫患者的脑神经元功能而减轻癫痫损害的作用^[8], 但其在宫颈癌中的生物学功能尚不完全清楚。

本研究发现, 宫颈癌组织中 miR-134 的表达水平呈降低趋势。表明 miR-134 在宫颈癌中可能是一种抑癌因子。miR-134 能够抑制体外培养 HeLa 细胞的增殖, 阻滞其细胞周期的进展并促进细胞凋亡的发生。有研究表明, miR-134 在结直肠癌^[9]转移及肺癌^[10]耐药中也具有调控作用。说明 miRNA-134 具有多样性的抗肿瘤作用, 值得人们进一步深入研究。

miR 能够通过结合靶基因 3'-UTR 区而发挥负向调控作用。通过生物信息学分析发现, 细胞周期蛋白 CCND1 的 mRNA 存在于 miR-134 的结合位点, 可能是 miR-134 的潜在靶点之一。过表达 miR-134 在体外的确能下调 CCND1 的表达水平。CCND1 是促进细胞从 G0/G1 期向 G1/S 期转变的主要调控因子^[11]。研究指出, CCND1 的异常高表达与宫颈癌的生长密切相关^[12]。因此, 下调 CCND1 的表达可能是 miR-134 发挥抗癌细胞生长作用的关键机制之一。

参 考 文 献:

[1] 黄永红. 复发宫颈癌发病因素及其不同治疗方式对预后的影响[J]. 心理医生, 2017, 23(9): 72-73.

- [2] 王春桃, 何曙芝, 徐敏, 等. miRNA 单核苷酸多态性与宫颈癌的相关性研究[J]. 现代预防医学, 2017, 44(7): 1220-1224.
- [3] 胡佳, 桂艳红, 谢平丽, 等. MicroRNA-33a 靶向 Twist1 调节宫颈癌细胞的侵袭[J]. 中南大学学报(医学版), 2015, 40(10): 1060-1067.
- [4] WANG W, REN F, WU Q, et al. MicroRNA-497 suppresses angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor A through the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways in ovarian cancer[J]. Oncol Rep, 2014, 32(5): 2127-2133.
- [5] SU X, ZHANG L, LI H, et al. MicroRNA-134 targets KRAS to suppress breast cancer cell proliferation, migration and invasion[J]. Oncol Lett, 2017, 13(3): 1932-1938.
- [6] 丁云, 陆肖玮. MicroRNA-134 通过下调叉头框蛋白 M1/ 人基质金属蛋白酶 2 表达抑制乳腺癌细胞迁移及侵袭[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(16): 43-48.
- [7] 张永一, 陈琦, 王维, 等. MicroRNA-134 调控环腺苷酸应答元件结合蛋白对老年小鼠术后认知功能障碍的影响[J]. 解放军医学院学报, 2017, 38(8): 783-788.
- [8] WANG X, LUO Y, LIU S, et al. MicroRNA-134 plasma levels before and after treatment with valproic acid for epilepsy patients[J]. Oncotarget, 2017, 8(42): 72748-72754.
- [9] YE Q, SU L, CHEN D, et al. Astragaloside IV induced miR-134 expression reduces EMT and increases chemotherapeutic sensitivity by suppressing CREB1 signaling in colorectal cancer cell line SW-480[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(4): 1617-1626.
- [10] 俞万钧, 汪一萍, 李纪鹏, 等. miR-134 调控人肺腺癌细胞顺铂耐药[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(7): 1214-1218.
- [11] JOHN R R, MALATHI N, RAVINDRAN C, et al. Mini review: Multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior[J]. Indian J Dent Res, 2017, 28(2): 187-192.
- [12] 梁少强, 张宁, 黄荣, 等. CCND1 基因 G870A 位点多态性对高危型 HPV 相关宫颈癌放疗敏感性的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2015, 40(11): 1205-1209.

(王荣兵 编辑)