

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.14.010

文章编号: 1005-8982(2017)14-0048-05

MicroRNA-182 在宫颈癌中的表达及对 肿瘤细胞增殖、侵袭及迁移的影响

宋霞,毛熙光

(西南医科大学附属医院 妇产科,四川 泸州 646000)

摘要:目的 探讨 MicroRNA(miR-182)在宫颈癌组织、宫颈上皮内瘤变组织(CIN)和正常宫颈组织中的表达,及其对宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响。**方法** 应用实时聚合酶链反应(real-time PCR)技术方法检测 78 例宫颈癌组织、30 例 CIN 组织及 20 例正常宫颈组织中 miR-182 的表达,并分析其与宫颈癌临床病理特征之间的关系。在宫颈癌细胞株 CaSki 中,应用细胞转染技术上调 miR-182 的表达,应用 Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒检测细胞增殖能力的变化,Transwell 实验检测细胞侵袭迁移能力的变化。**结果** Real-time PCR 结果显示 miR-182 在宫颈癌组织、宫颈上皮内瘤变(CIN)组织与正常宫颈组织比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);两两比较,miR-182 在宫颈癌组织和 CIN 组织中的表达较正常宫颈组织降低($P < 0.05$),miR-182 在宫颈癌组织与 CIN 组织比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),宫颈癌组织中 miR-182 的表达与分化程度、淋巴转移密切相关,而与年龄、肿瘤直径、浸润深度及临床分期等无关($P > 0.05$)。在人宫颈癌上皮细胞(CaSki)中,上调 miR-182 表达能够抑制肿瘤细胞的侵袭和迁移($P < 0.05$),但不改变细胞的增殖能力。**结论** miR-182 在宫颈癌组织中低表达,miR-182 的表达水平与分化程度和淋巴转移有关,上调 miR-182 的表达能够抑制宫颈癌 CaSki 细胞的迁移及侵袭。

关键词: miR-182;宫颈癌;增殖;侵袭;迁移

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Expression of miR-182 in cervical cancer and its effect on proliferation, invasion and migration of cervical cancer cells

Xia Song, Xi-guang Mao

(Department of Gynaecology and Obstetrics, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000 China)

Abstract: Objective To investigate the expression of miR-182 in cervical cancer, cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and normal cervical tissue, and to discuss its effect on proliferation, invasion and migration of cervical cancer cells. **Methods** The expression level of miR-182 was detected by real-time PCR in 78 samples of cervical cancer tissues, 30 samples of CIN tissues and 20 samples of normal cervical tissues. The relationships between miR-182 expression and clinicopathological features of cervical cancer were analyzed. Cervical cancer CaSki cells were transfected with miR-182 mimics. CCK-8 assay and Transwell assay were used to analyze the effects of miR-182 on the proliferation, invasion and migration of cervical cancer cells. **Results** The expression level of miR-182 showed significant differences among the cervical cancer tissues, the CIN tissues and the normal cervical tissues ($P < 0.05$). Pairwise comparisons showed the miR-182 expression in the cervical cancer tissues and the CIN tissues was significantly lower than that in the normal cervical tissues ($P < 0.05$), but the difference between the cervical cancer tissues and the CIN tissues was not statistically significant ($P > 0.05$). The expression level of miR-182 in the cervical cancer tissues was significantly correlated with degree

收稿日期:2016-06-15

[通信作者] 毛熙光, E-mail: maoxiguangfck@163.com

of differentiation and lymphatic metastasis ($P < 0.05$), but not in significant correlation with age, tumor diameter, depth of invasion or clinical stages ($P > 0.05$). Transwell assay showed that up-regulated miR-182 expression would significantly reduce the migration and invasion of the cervical cancer CaSki cells ($P < 0.05$). CCK-8 assay showed that up-regulated miR-182 expression had no effect on the proliferation of the cervical cancer cells ($P > 0.05$). **Conclusions** The expression level of miR-182 is obviously declined in cervical cancer tissues and is related to degree of differentiation and lymphatic metastasis. The up-regulated miR-182 expression can inhibit the invasion and migration of cervical cancer CaSki cells.

Keywords: miR-182; cervical cancer; proliferation; invasion; migration

宫颈癌是女性发病率较高的恶性肿瘤之一,已居第 2 位^[1]。目前,已证实人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染特别是人乳头瘤病毒 16 型(human papillomavirus, HPV16)感染是宫颈癌发病的重要原因,但 HPV 感染并非宫颈癌发病的唯一因素^[2]。microRNA(miRNA)是内源性非编码小 RNA,由 19~25 个核苷酸组成,可以引起靶基因 mRNA 的降解或翻译抑制调节基因的表达。近年来研究发现,miRNAs 的表达异常与肿瘤关系密切但具体机制不同。近年来研究发现 miR-182 与肺癌、结直肠癌、胃癌或乳腺癌等多种恶性肿瘤关系密切,在肿瘤的发生、发展过程中发挥着类似癌基因或抑癌基因的作用^[3-6]。但迄今为止,有关 miR-182 在宫颈癌方面的研究国内外甚少报道。本研究通过实时聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)技术方法检测宫颈癌组织、宫颈上皮内瘤变组织(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)及正常宫颈组织中 miR-182 的表达情况,并观察 miR-182 对宫颈癌细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响,探索其在宫颈癌发生、发展过程中可能的作用,希望为宫颈癌的辅助诊断及靶向治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取 2013 年 3 月-2015 年 6 月在西南医科大学附属医院手术切除的宫颈鳞癌组织标本 78 例,患者术前均未接受过放疗或化疗,并收集同期在本院接受治疗的 CIN 患者的 CIN 组织标本 30 例及 20 例因妇科良性疾病行全子宫切除患者的正常宫颈组织标本。将收集的组织标本在离体 20 min 内置于液氮速冻,置入 -80°C 冰箱冷冻保存备用。标本的病理诊断由 2 位病理科高年资医生盲法阅片明确,宫颈癌患者分期依据国际妇产科联盟 2000 年标准进行分期。宫颈癌细胞株 CaSki 购自中国协和医科大学基础医学研究所,用含有 100 g/ml 链霉素、100 u/ml、10%及

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的高糖培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM),置于 37°C , 5%二氧化碳 CO_2 的饱和湿度培养箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 总 RNA 提取试剂 Trizol 及 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司, hsa-miR-182 mimics 及阴性对照购自上海吉玛公司, miRNA cDNA Synthesis Kit 试剂盒及 SYBR® Primix EX Taq™ 试剂盒均购自日本 Takara 公司, CCK-8 试剂盒购自上海东仁化学科技公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司, 高糖 DMEM、胎牛血清、青-链霉素、0.25% 胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司, CFX96 real-time PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2.2 Real-time PCR 检测 miR-182 的表达水平 取液氮保存组织及转染 48 h 后的各组细胞, 参照 Trizol 试剂说明书操作提取总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度及纯度后, 参照 miRNA cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书进行逆转录, 使用 SYBR® Primix EX Taq™ 试剂盒进行 PCR 反应, 均严格按照说明书步骤进行操作。miR-182 引物设计: 正向引物: 5'-TTTGGCAATGGTAGAACTCACACT-3', 反向引物: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG-3'; U6 正向引物: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'; 反相引物 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'。miR-182 mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.2.3 宫颈癌细胞株 CaSki 的转染 将宫颈癌细胞株 CaSki 接种后 24 h, 当细胞生长密度达 50%~70% 时进行细胞转染操作, 参照 Lipofectamine™ 2000 试剂说明书将 hsa-miR-182 mimics 及阴性对照转染 CaSki 细胞, Real-time PCR 检测转染 hsa-miR-182 mimics 组细胞及转染阴性对照组 CaSki 细胞 miR-182 的表达情况。

1.2.4 CCK-8 检测上调 miR-182 表达对 CaSki 细胞增殖能力的影响 将经过转染操作的各组细胞接

种于 96 孔板常规培养, 在 24、48 及 72 h 3 个时间点向每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 培养箱孵育 2 h, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 实验重复 3 次。

1.2.5 Transwell 实验检测上调 miR-182 表达对 CaSki 细胞侵袭迁移能力的影响 将以无血清细胞冻存 (roswell park memorial institute, RPMI 1640) 稀释的 Matrigel 基质胶包被 transwell 小室基底膜的上室面, 加入 100 μ l 无血清培养基稀释的各组细胞悬液, 于小室下层加入含 10% 血清的 RPMI 1640 培养液, 37 $^{\circ}$ C 孵箱培养, 24 h 取出培养小室, 湿棉签轻轻拭去基质胶及上层小室内未侵袭的细胞, 甲醛固定、染色, 将小室倒置, 显微镜下选 5 个计数穿出细胞数目。迁移试验操作同侵袭试验, 但迁移试验中 Transwell 小室基底膜不加 Matrigel 基质胶。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间均数的比较用独立样本 t 检验, 3 组间比较用方差分析, 差异有统计学意义后用 SNK- q 检验, 进行两两比较, 多时点资料的比较用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-182 在宫颈鳞癌组织、CIN 组织及正常宫颈组织中的表达

Real-time PCR 检测结果显示, miR-182 在宫颈鳞癌组织、CIN 组织及正常宫颈组织中的表达分别是 (0.30 ± 0.10) 、 (0.34 ± 0.14) 和 (1.03 ± 0.11) , 3 组比较差异有统计学意义 ($F = 348.930, P = 0.000$); 正常宫颈组织和宫颈癌组织比较, 差异有统计学意义 ($q = 36.773, P = 0.000$); 正常宫颈组织和 CIN 组织比较, 差异有统计学意义 ($q = 30.178, P = 0.000$)。宫颈鳞癌组织与 CIN 组织比较, 差异无统计学意义 ($q = 2.351, P = 0.101$)。见图 1。

2.2 miR-182 的表达与宫颈鳞癌临床病理特征的关系

宫颈鳞癌组织中 miR-182 的表达量在分化程度、淋巴转移等方面的比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而在年龄、肿瘤直径、浸润深度及临床分期等方面比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 转染后各组细胞 miR-182 表达的变化

Real-time PCR 检测结果显示, 转染 hsa-miR-182 mimics 组和阴性对照组 CaSki 细胞 miR-182 的

表达量分别为 (90.9 ± 10.1) 和 (1.09 ± 0.08) , 两组比较, 差异有统计学意义 ($t = 15.401, P = 0.000$), hsa-miR-182 mimics 组表达水平高于阴性对照组。见图 2。

2.4 上调 miR-182 表达对 CaSki 细胞增殖能力的影响

CCK-8 实验显示转染后 24、48 和 72 h 3 个时间, 采用重复测量数据的方差分析, 转染 hsa-miR-182 mimics 组细胞和阴性对照组吸光度比较, 差异无统计学意义 ($F = 0.018, P = 0.893$), 说明上调 miR-182 表达对 CaSki 细胞增殖能力无影响, 见图 3。

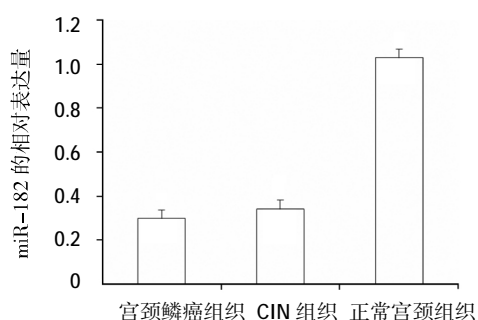


图 1 miR-182 在宫颈鳞癌组织、CIN 组织及正常宫颈组织中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

表 1 宫颈鳞癌组织中 miR-182 的表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	miR-182	t 值	P 值
年龄				
≥ 45 岁	50	0.29 ± 0.09	1.250	0.215
< 45 岁	28	0.32 ± 0.12		
临床分期				
I 期	53	0.30 ± 0.09	0.400	0.690
II A 期	25	0.31 ± 0.13		
肿瘤直径				
≥ 4 cm	30	0.33 ± 0.11	1.640	0.105
< 4 cm	48	0.29 ± 0.09		
淋巴结转移				
有	26	0.18 ± 0.04	9.091	0.000
无	52	0.36 ± 0.13		
分化程度				
高分化	22	0.50 ± 0.16	8.656	0.000
中低分化	56	0.22 ± 0.08		
浸润深度				
$\geq 1/2$ 间质	38	0.31 ± 0.11	0.820	0.415
$< 1/2$ 间质	40	0.29 ± 0.09		

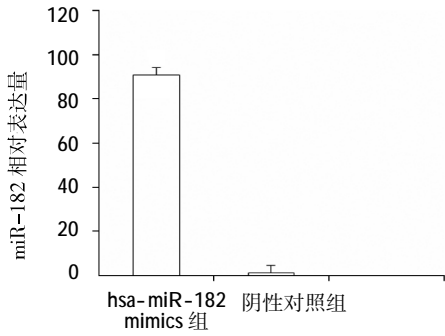


图 2 转染后各组细胞 miR-182 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

2.5 上调 miR-182 表达对 CaSki 细胞侵袭和迁移能力的影响

Transwell 迁移实验显示转染 hsa-miR-182 mimics 组穿入到下层小室的细胞数目为(185 ± 20)个 / 高倍镜,阴性对照组为(399 ± 25)个 / 高倍镜,两组比较,差异有统计学意义细胞数($t=11.577, P=0.000$)阴性对照组细胞数多于转染 has-miR-182

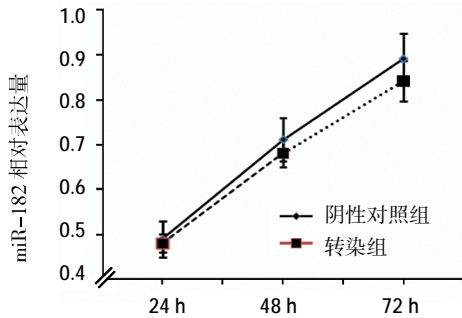
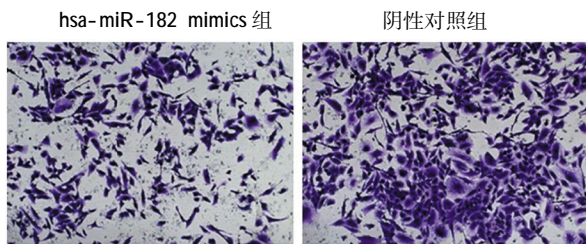


图 3 两组细胞不同时间吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s$)



迁移试验 ($\times 100$)

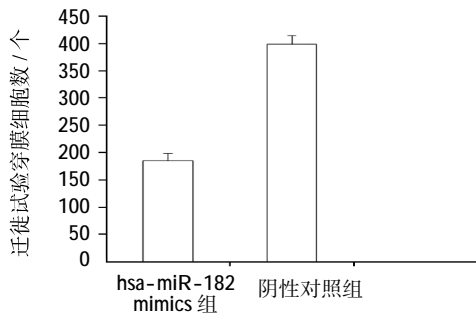
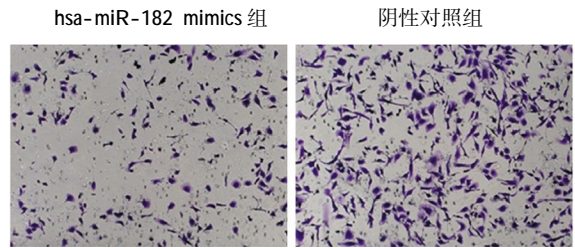


图 4 上调 miR-182 表达抑制 CaSki 细胞的迁移能力 ($\bar{x} \pm s$)

mimics 组。Transwell 侵袭实验显示,转染 hsa-miR-182 mimics 组穿过基质胶到下层小室的细胞数目为(98 ± 12)个 /HP,阴性对照组为(215 ± 22)个 /HP,两组比较,差异有统计学意义($t=8.087, P=0.001$),阴性对照组细胞数多于转染 hsa-miR-182 mimics 组,说明上调 miR-182 表达能抑制 CaSki 细胞的侵袭及迁移能力,见图 4、5。



侵袭实验 ($\times 100$)

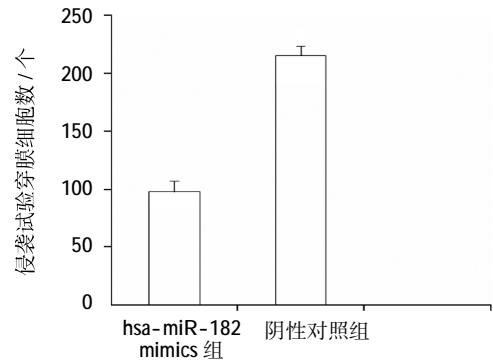


图 5 上调 miR-182 表达抑制 CaSki 细胞的侵袭能力 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

近年来研究发现,占人类基因组不到 1%的 miRNA 在机体的生长、发育、分化及凋亡等生理过程的调控中起着至关重要的作用,调控人类约 1/3 基因的表达。越来越多的证据表明,miRNAs 在多种恶性肿瘤的发生发展中起着至关重要的作用,miRNA 被证实起着癌基因或抑癌基因的作用。

2003 年 LAGOS-QUINTANA 等^[7]在小鼠的眼中第 1 次发现 miR-182,其定位于人 7 号染色体,与 miR-96、miR-183 形成一个基因簇。早期研究发现 miR-182 与听力和视力的发育及某些疾病相关^[8]。近年来,大量研究证实 miR-182 参与多种恶性肿瘤的进程,但研究发现 miR-182 的作用机制复杂,在某些恶性肿瘤中起着抑癌基因的作用,而在某些恶性肿瘤中却又起着癌基因的作用。MOSKWA 等^[9]在研究中发现,miR-182 通过对靶基因 BRCA1 的抑制促

进肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移。在结直肠癌的研究中, YANG 等^[4]报道 miR-182 通过抑制 SATB2 基因促进结直肠癌的增殖及转移的发生。有关 miR-182 肝癌中的研究中也发现 miR-182 起着类似癌基因的作用^[9]。但目前也有研究表明, miR-182 在肺癌^[11]、胶质瘤^[12]中却起着类似抑癌基因的作用, 抑制肿瘤细胞的侵袭及转移^[11-12]。HU 等^[13]报道, miR-182 在骨肉瘤中同样也起着抑癌基因的作用。miR-182 的不同作用可能与 miR-182 在不同的肿瘤组织中作用的下游靶基因不同有关, 但目前为止, 有关 miR-182 对宫颈癌发生、发展方面的研究甚少, 国内外鲜有报道。为明确 miR-182 在宫颈癌发生、发展中可能的作用, 本研究通过 real-time PCR 检测 miR-182 在宫颈鳞癌组织、宫颈 CIN 组织及正常宫颈组织中的表达时发现, miR-182 在宫颈鳞癌组织和宫颈 CIN 组织中的表达低于正常宫颈组织, 而 miR-182 在宫颈鳞癌组织和宫颈 CIN 组织中的表达水平比较, 无明显差异, 说明 miR-182 表达水平降低在 CIN 时就起到一定的作用, miR-182 表达水平降低促进宫颈癌的发生、发展。随后在研究 miR-182 表达水平与宫颈癌患者临床病理特征的关系时发现, miR-182 的表达水平与宫颈癌患者分化程度、淋巴转移密切相关, 低分化组织中 miR-182 的表达水平低于高分化组织, 有淋巴结转移的组织中 miR-182 的表达水平低于无淋巴结转移的组织, 进一步证实 miR-182 表达水平降低促进宫颈癌的发展。

恶性肿瘤的浸润及转移是影响肿瘤患者生存期最重要的原因之一, 已有研究证实在肺癌中 miR-182 可以抑制肺癌细胞的增殖及侵袭^[11]。本研究 CCK-8 实验显示, 上调 miR-182 表达对 CaSki 细胞增殖能力并无影响, 但是在 Transwell 迁移和侵袭试验中发现上调 miR-182 表达可以抑制 CaSki 细胞的侵袭及迁移能力。

目前有关 miR-182 与恶性肿瘤预后关系方面的研究较少, CHEN 等^[14]在研究中发现胰腺癌患者血浆中 miR-182 水平增高, 并且与患者的不良预后相关。目前, 尚未有 miR-182 与宫颈鳞癌患者预后关系的研究报道, 笔者将后续对患者进行随访, 以探讨 miR-182 与宫颈鳞癌患者预后的关系。

综上所述, miR-182 在宫颈癌和 CIN 组织中表达下降, 并与淋巴转移、分化程度有关, 上调 miR-182 表达可以抑制宫颈癌细胞的侵袭及迁移, 推测 miR-182 与宫颈癌的发生、发展有着一定的关系, 可

能为宫颈癌的早期诊断和治疗提供新的方向, 但是 miR-182 调控宫颈癌发生、发展的具体的分子生物学机制尚不明确, miR-182 调控宫颈癌的下游靶基因通路尚需进一步的深入研究。

参 考 文 献:

- [1] 赵丽雅, 庞晓燕, 张颐, 等. 辽宁地区 12307 例女性宫颈高危型人乳头瘤病毒感染筛查结果分析[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(26): 64-67.
- [2] 吴江, 汪宏良, 李美霞. 宫颈腺鳞癌人乳头瘤病毒基因型的分布、临床病理参数对预后的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(1): 99-104.
- [3] ZHU Y J, XU B, XIA W. Hsa-mir-182 downregulates RA-SA1 and suppresses lung squamous cell carcinoma cell proliferation[J]. Clin Lab, 2014, 60(1): 155-159.
- [4] YANG M H, YU J, JIANG D M, et al. MicroRNA-182 targets special AT-rich sequence-binding protein 2 to promote colorectal cancer proliferation and metastasis [J]. Journal of Translational Medicine, 2014, 12: 109.
- [5] SACHDEVA M, MITO J K, LEE C L, et al. MicroRNA-182 drives metastasis of primary sarcomas by targeting multiple genes[J]. J Clin Invest, 2014, 124(10): 4305-4319.
- [6] LEI R, TANG J, ZHUANG X, et al. Suppression of MIM by microRNA-182 activates RhoA and promotes breast cancer metastasis[J]. Oncogene, 2014, 33(10): 1287-1296.
- [7] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, MEYER J, et al. New microRNAs from mouse and human[J]. RNA, 2003, 9(2): 175-179.
- [8] 邢蔚, 闰辉, 米文娟, 等. MiR-182 可以促进耳蜗前体细胞分化为毛细胞[J]. 中华耳科杂志, 2014, 12(2): 312-315.
- [9] MOSKWA P, BUFFA F M, PAN Y F, et al. MiR-182-mediated down-regulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors[J]. Mol Cell, 2011, 41(2): 210-220.
- [10] WANG C G, REN R, HU H L, et al. MiR-182 is up-regulated and targeting Cebpa in hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Cancer Res, 2014, 26(1): 17-29.
- [11] ZHANG L, LIU T, HUANG Y, et al. MicroRNA-182 inhibits the proliferation and invasion of human lung adenocarcinoma cells through its effect on human cortical actin-as-associated protein[J]. Int J Mol Med, 2011, 28(3): 381-388.
- [12] KOURI F M, HURLEY L A, DANIEL W L, et al. MiR-182 integrates apoptosis, growth, and differentiation programs in glioblastoma[J]. Genes Dev, 2015, 29(7): 732-745.
- [13] HU J, LV G, ZHOU S, et al. The downregulation of miR-182 is associated with the growth and invasion of osteosarcoma cells through the regulation of TIAM1 expression[J]. PLoS One, 2015, 10(5): DOI: 10.1371/journal.pone.0121175.
- [14] CHEN Q L, YANG L J, XIAO Y L, et al. Circulating microRNA-182 in plasma and its potential diagnostic and prognostic value for pancreatic cancer[J]. Medical Oncology, 2014, 31(11): 225.

(李科 编辑)