

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.23.010

文章编号: 1005-8982(2016)23-0047-06

临床论著

MicroRNA-93 在宫颈癌中的表达 及其对细胞生物学行为的影响

林忠

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 探讨 microRNA-93(miR-93)在宫颈癌组织中的表达及其对宫颈癌细胞生物学行为的影响。
方法 收集 2014 年 1 月 -2014 年 7 月中南大学湘雅医院有完整病历资料的 41 例宫颈癌患者组织标本及对应癌旁组织,实时荧光定量-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测宫颈癌组织中 miR-93 表达水平;采用脂质体转染法将 miR-93 模拟片段(mimic)转染入宫颈癌 Hela 细胞,恢复细胞内 miR-93 表达;活细胞计数试剂盒(CCK-8)和流式细胞术检测 miR-93 对宫颈癌 Hela 细胞增殖及凋亡的影响;Transwell 小室法检测其对 Hela 细胞迁移及侵袭能力的影响;Western blot 检测 Hela 细胞中上皮生长因子受体(EGFR)及其下游蛋白的表达量变化。**结果** 41 例宫颈癌患者肿瘤组织中 miR-93 表达量(0.048 ± 0.013)低于癌旁组织(0.113 ± 0.025),差异有统计学意义($P=0.026$);转染 miR-93 模拟片段后,宫颈癌 Hela 细胞中 miR-93 表达恢复;与对照组和空白组比较,实验组宫颈癌细胞增殖能力下降($P=0.004$),早期凋亡比例增加($P=0.032$),侵袭($P=0.003$)和迁移能力下降($P=0.003$);过表达 miR-93 的 Hela 细胞 EGFR 及下游的 p-AKT 表达下降($P=0.005$),而总 AKT 蛋白无明显变化($P=0.372$)。**结论** miR-93 在宫颈癌组织中的表达量下降,恢复其在宫颈癌细胞中的表达能够明显抑制其细胞增殖、迁移和侵袭,促进细胞凋亡,其机制部分与 miR-93 抑制宫颈癌细胞 EGFR/AKT 信号通路活性有关。

关键词: 宫颈癌;microRNA-93;EGFR/AKT 信号通路;生物学行为

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Characterization of miR-93 expression and investigation of its biological function in cervical cancer

Zhong Lin

(Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

Abstract: Objective To investigate the expression level of miR-93 in cervical cancer tissues and its effects on the biological functions of the cancer cells. **Methods** Forty-one paired cervical cancer tissues and adjacent normal tissues were collected from Xiangya Hospital of Central South University from Jan. 2014 to Jul. 2014, and all the collected tissues had complete medical records. Using qRT-PCR, the expression of miR-93 was explored in the 41 paired cervical cancer tissues and adjacent normal tissues. miR-93 mimic was transfected into cervical cancer Hela cells to restore the expression of miR-93. The proliferation and apoptosis effects of miR-93 on Hela cells were evaluated by cell counting kit-8 (CCK-8) and flow cytometry, respectively. Moreover, the migration and invasion of transfected Hela cells were detected by Transwell chamber assay. Western blot was used to measure the expressions of EGFR and its downstream protein in the Hela cells. **Results** The expression of miR-93 was significantly decreased in the 41 cervical cancer tissues compared with the adjacent normal tissues [(0.048 ± 0.013) vs (0.113 ± 0.025) , $P=0.026$]. By transfection of miR-93 mimic fragment, miR-93 expression recovered in the cervical cancer Hela cells. Overexpression of

收稿日期:2015-10-23

miR-93 through exogenous transfection with miR-93 mimic significantly suppressed cell proliferation ($P = 0.004$), induced cell apoptosis ($P = 0.032$), and inhibited cell migration and invasion ($P = 0.003$). Moreover, miR-93 overexpression of Hela cells significantly suppressed the expressions of EGFR and its downstream p-AKT ($P = 0.005$), while did not influence the expression of total AKT ($P = 0.372$), which suggested that overexpression of miR-93 significantly suppressed the EGFR/AKT signaling pathway in cervical cancer cells.

Conclusions The expression of miR-93 is significantly decreased in cervical cancer tissues. Restored expression of miR-93 could suppress cell proliferation, migration and invasion, and induce cell apoptosis through, at least partially, suppression of EGFR/AKT signaling pathway.

Keywords: cervical cancer; miR-93; EGFR/AKT signaling pathway

宫颈癌是美国女性中第 6 位常见癌症,也是第 2 位常见的妇科肿瘤。美国平均每 2 500 例绝经妇女中就有 1 例宫颈癌,占因癌症死亡病例的 5%~6%。为提高宫颈癌患者长期生存率,改善患者临床结局,降低宫颈癌发生风险,筛选和识别能够早期发现宫颈癌的生物标志物具有十分重要的意义^[1]。

MicroRNA(miRNA)是一系列高度保守非编码 RNA,其长度为 18~25 个核苷酸。近年来研究发现,癌组织中的 miRNA 表达异于正常组织,很多 miRNA 具有致肿瘤活性或肿瘤抑制活性^[2-3],miRNA 在致癌过程中起重要作用,可以作为宫颈癌诊断的生物标志物。

miR-93、miR-106b 和 miR-25 属于同一个 miRNA 集群,即 miR-106b-25^[4],其参与多种细胞生物学过程^[5-7]。此外,大量的实验表明 miR-93 在不同的人类恶性肿瘤中起重要作用。本研究通过检测 miR-93 在宫颈癌及其癌旁组织中的表达及对宫颈癌 Hela 细胞的主要生物学行为的影响,探讨 miR-93 在宫颈癌发生、发展中的作用及可能机制,为宫颈癌早期临床诊断和靶向治疗提供新的理论依据与方向。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2014 年 1 月-2014 年 7 月中南大学湘雅医院经手术病理证实的原发性宫颈癌患者冻存的癌组织标本及相应的癌旁组织(距病灶 2 cm 的正常组织)标本共 41 例,均有完整病历资料。患者手术前均未行放射治疗、化学治疗、生物治疗等。采用 2009 年国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics,FIGO)的临床分期标准,I 期 10 例,II 期 8 例,III 期 23 例;病理组织学分级中,高、中分化 19 例,低分化 22 例;患者年龄 26~61 岁,平均(46±12)岁。

1.2 细胞系

人宫颈癌细胞株 Hela、siha、caski、c4-1 和人正常宫颈上皮细胞株 H8 均购自中国典型培养物保藏中心(China Center For Type Culture Collection, CCTCC),细胞在 37℃、含 5%二氧化碳 CO₂ 的培养箱内,用含 10%小牛血清的达尔伯克必需基本培养基(dulbecco's minimum essential medium,DMEM)高糖培养基(美国 Hyclone 公司)培养,培养基中分别加入终浓度为 100 mg/L 的链霉素与青霉素,细胞贴壁生长 24 h。细胞用 0.05%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(ethylenedinitrilo tetraacetic acid,EDTA)消化传代,选取对数生长期细胞进行后续实验。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应检测 miR-93 表达水平

Trizol 提取宫颈癌及宫颈癌细胞株总 RNA,用 miR-93 检测试剂盒检测 miR-93 表达水平,取 10 ng 总 RNA 与 3 μl 逆转录酶混合,在 15 μl 反应体系中,16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min,进行逆转录。而后将逆转录产物 cDNA 150 倍稀释,取 2 μl 稀释的 cDNA 与 2 μl Taqman 引物混合,在 20 μl 反应体系中,95℃变性 10 min,95℃变性 15 s,60℃退火 60 s,共 40 个循环。细胞中 miRNA 表达用 U6sn RNA 为内对照,相对 miRNA 表达水平用 2^{-ΔΔCt} 计算改变倍数。

1.4 细胞培养及细胞增殖和周期分析

Hela 宫颈癌细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37℃、5%CO₂ 条件下培养。传代培养至细胞对数生长期,随机将细胞分为对照组和实验组。采用脂质体转染法将 miR-93 mimics 和对照 mimics 分别转染实验组和对照组 Hela 细胞 24 h 后,细胞置无血清 DMEM 培养基中饥饿 12 h 后,换用 DMEM 完全培养基继续培养。12 h 后离心收集细胞,弃上清,用预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗细胞 2 次,加入预冷 70%乙醇,于 4℃固定过

夜。离心收集细胞, PBS 洗细胞 1 次, 加入 PBS 溴化乙啶染色液避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测, 活细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞增殖情况。

1.5 Transwell 侵袭及迁移实验

Hela 细胞转染后 48 h, 用无血清 DMEM 培养基饥饿 16 h。调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml, 每个侵袭小室加 100 μ l 细胞悬液, 每个侵袭小室下室加 600 μ l 含 10% FBS 的 DMEM 培养基。其中侵袭实验在小室接种细胞前一晚, Matrigen (基质胶) 用无血清 DMEM 培养基稀释成浓度为 1:7, 每个侵袭小室加 60 μ l, 而迁移实验不加基质胶。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 侵袭实验 28 h 后再迁移实验 20 h, 取出小室用 90% 乙醇固定, 0.1% 结晶紫溶液染色, 置于显微镜下观察并拍照, 随机选取 4 个低倍视野 ($\times 100$) 进行细胞计数, 并计算平均值。实验重复 2 次。

1.6 Western blot 检测 miR-93 对 ATK 蛋白表达的影响

将两组细胞裂解后收集细胞, 经超声机粉碎、离心, 取上清液与上样缓冲液煮沸制成蛋白质样品。取等量样品依次经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) (美国 Millipore 公司) 转膜, 脱脂奶粉及 Western blot 封膜液封闭, 然后分别加入 AKT, p-AKT、表皮生长因子受体 (epithelial growth

factor receptor, EGFR)、磷酸化表皮生长因子受体 (phospho-epithelial growth factor receptor, pEGFR)、兔抗大鼠多克隆抗体及大鼠抗 β -actin 单克隆抗体, 再加入山羊抗兔及山羊抗鼠二抗, 采用化学发光检测系统, 将化学发光底物加于 PVDF 膜上, 并在 SYNGENE Chem Genius 成像系统成像。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用方差分析, 若方差齐则组间两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-93 在宫颈癌及宫颈癌细胞株中的表达

实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real time-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 41 例宫颈癌及其相应癌旁组织中 miR-93 的表达, 结果发现, miR-93 在宫颈癌组织中的表达水平明显低于其相应癌旁组织 (0.048 ± 0.013 vs 0.113 ± 0.025 , $P = 0.026$) (见图 1)。41 例宫颈癌组织中, 有 29 例 miR-93 表达水平低于其相应癌旁组织 (70.73%, 29/41)。qRT-PCR 检测结果表明, 宫颈癌细胞中 miR-93 的表达明显低于正常宫颈上皮细胞株 H8, 尤其是 Hela 细胞, 后续功能实验均采用 Hela 细胞作为研究对象以分析 miR-93 对宫颈癌细胞生物学行为的影响 (见表 1 和图 2)。

表 1 miR-93 在宫颈癌细胞和正常宫颈上皮细胞中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Hela	siha	caski	c4-1
宫颈癌细胞	0.017 ± 0.011	0.038 ± 0.012	0.042 ± 0.014	0.029 ± 0.007
正常宫颈上皮细胞株 H8	0.072 ± 0.016	0.072 ± 0.016	0.072 ± 0.016	0.072 ± 0.016
<i>t</i> 值	12.374	9.427	8.735	10.162
<i>P</i> 值	0.001	0.010	0.012	0.005

2.2 细胞转染

将 miR-93 mimics 转染 Hela 细胞, 转染成功后, 在荧光显微镜下可观察到绿色荧光。见图 2。

2.3 miR-93 对 Hela 细胞增殖的影响

Hela 细胞转染 miR-93 mimics 72 h 后细胞增殖能力逐渐下降, 实验组 72、96 和 120 h 的细胞增殖能力低于对照组和空白组 ($P = 0.004$)。见图 3。

2.4 miR-93 对 Hela 细胞凋亡的影响

空白组、对照组及实验组的凋亡率分别为 (6.8 ± 0.8)%、(8.1 ± 1.1)% 和 (15.3 ± 1.5)%, 对 3 组凋亡率

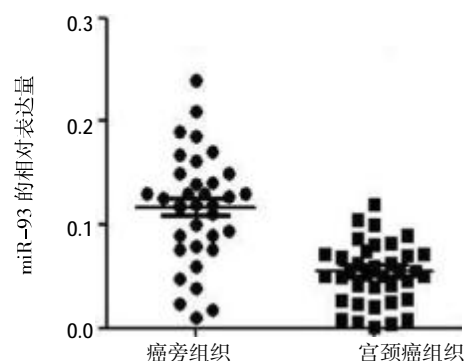
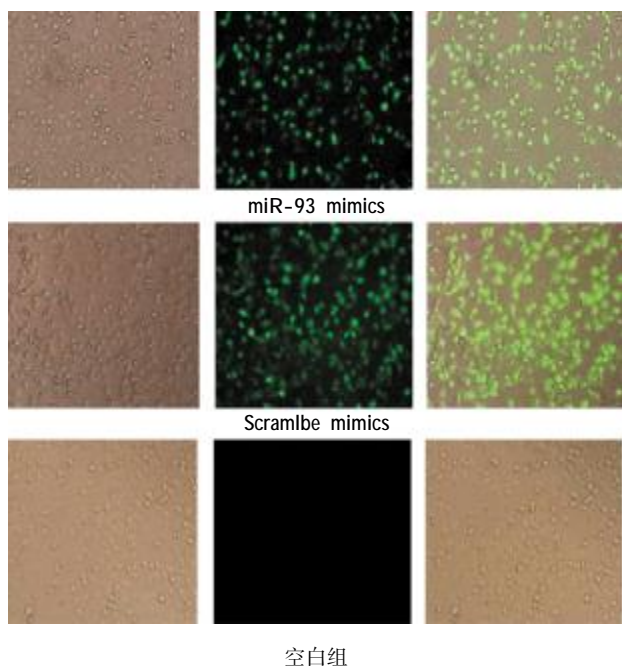


图 1 miR-93 在宫颈癌组织及其癌旁组织的表达 ($\bar{x} \pm s$)



左、中、右分别为：普通显微镜、荧光显微镜及合并图

图 2 miR-93 mimics 转染 HeLa 细胞

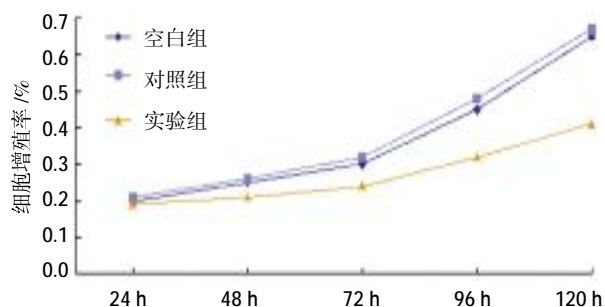
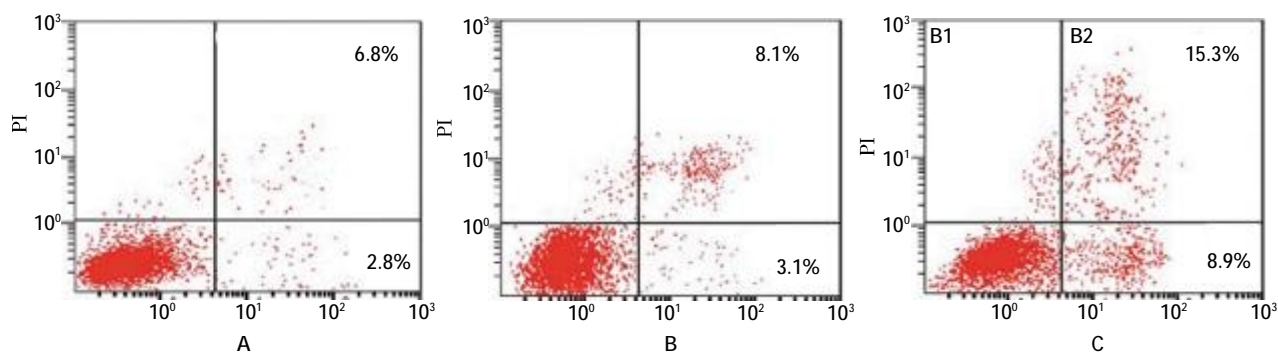


图 3 转染 miR-93 mimics 后抑制 HeLa 细胞生长 ($\bar{x} \pm s$)

进行随机方差分析后发现,3 组间差异有统计学意义($t=7.246, P=0.027$),空白组和对照组比较经单因素方差分析,差异无统计学意义($P=0.286$);实验组和空白组比较,差异有统计学意义($P=0.032$)。提示 miR-93 可促进 HeLa 细胞凋亡。见图 4。

2.5 miR-93 对宫颈癌 A2890 细胞侵袭、迁移能力的影响

宫颈癌 HeLa 细胞转染 miR-93 mimics 后,其迁移和侵袭功能受到明显影响。随机方差分析后发现



A:空白组;B:对照组;C:实验组

图 4 miR-93 过表达后对 HeLa 细胞凋亡的影响

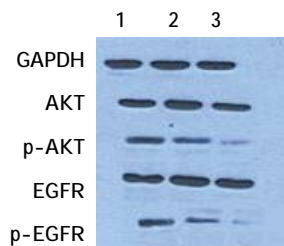
3 组细胞侵袭($t=6.472, P=0.031$)和迁移($t=7.886, P=0.025$)结果差异有统计学意义。实验结果表明,与对照组比较,实验组转染 miR-93 mimics 后,细胞的迁移($t=7.984, P=0.024$)、侵袭($t=6.837, P=0.029$)能力显著降低(见表 2)。

2.6 miR-93 表达对 PTEN/PI3K/AKT 信号通路的影响

本研究检测表达过 miR-93 后宫颈癌细胞中 EGFR 蛋白及其下游的 AKT 及 p-AKT 蛋白表达量的变化。HeLa 转染 miR-93 mimics 后细胞中 p-EGFR 及 p-AKT 蛋白表达下降($P=0.005$),但是总的 EGFR 和 AKT 蛋白表达无明显变化($P=0.372$),提示过表达 miR-9 后抑制宫颈癌细胞中 EGFR/AKT 信号通路的活性。见图 5。

表 2 miR-93 对 HeLa 细胞迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
空白组	118.4 ± 8.4	127.6 ± 14.3
对照组	114.5 ± 7.9	124.5 ± 11.7
实验组	67.8 ± 5.8	75.2 ± 7.8



1:空白组;2:对照组;3:实验组

图 5 Western blot 检测 miR-93 对 EGFR 及 AKT 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

宫颈癌恶性程度高的主要原因是难以早期发现而且缺乏治疗晚期及复发患者的有效方法。因此,识别和发现能够早期诊断宫颈癌,并能协助优化和个体化治疗的预测性标志物对宫颈癌诊治具有十分重大的意义。目前已有大量研究证实,miRNAs 发挥类似癌基因或抑癌基因作用。有学者建议将数种 miRNAs 作为宫颈癌的特异性标志,血液循环中 miRNAs 水平有望成为有价值的预后和诊断性生物标志物,如 miR-200 家族、miR-199/214 簇或者 let-7 等。多种 miRNAs 都可能成为宫颈癌扩散或转移的治疗靶点,尽管还有很多困难尚未解决,但是 miRNAs 疗法可能是预防和治疗宫颈癌的有效手段。

miR-106b-25 簇由高度保守的 miRNA-106b (miR-106b)、miRNA-93 (miR-93) 和 miRNA-25 (miR-25) 组成,以往研究表明在多种癌症中 miR-106b-25 簇过表达,如胃癌、前列腺癌、胰腺神经内分泌、成神经细胞瘤和多发性骨髓瘤等^[9]。研究表明 miR-106b-25 miRNA 簇可作为原癌基因。许多研究还证实肿瘤形成的主要机制包括与 MCM7 协作进行靶向 PTEN 促使细胞增殖^[9]。尽管证据表明 miR-106b-25 簇成员可作为原癌基因,但是在实际研究中发现 miR-106b-25 簇成员也能作为肿瘤抑制因子抑制肿瘤生长^[10],这一矛盾的分子机制尚不清楚。

本研究结果显示,与癌旁正常宫颈组织比较,宫颈癌组织中 miR-93 表达显著降低。大量的研究表明 miRNAs 参与了各种类型人类肿瘤发生以及发展,与正常组织比较,肿瘤组织中 miR-93 是众多异常表达的 miRNA 之一。以往研究认为 miR-93 是致癌 miRNA,在小细胞肺癌^[11]、骨肉瘤^[12]、喉癌^[13]和肝细胞癌等肿瘤中表达上调。然而 TANG 等^[14]研究发现 miR-93 在结肠癌中的表达明显低于正常结肠黏膜组织,本研究中笔者也发现与癌旁正常宫颈组织比较,宫颈癌组织中 miR-93 表达水平显著降低,猜测 miR-93 在不同肿瘤中作用的差异可能是由不同的肿瘤异质性引起。

本实验转染 miR-93 mimics 至内源性低表达 miR-93 的宫颈癌 Hela 细胞,结果表明 Hela 细胞增殖、抗凋亡、侵袭和迁移能力下降,证实 miR-93 在宫颈癌中发挥抑癌作用。TANG 等^[14]研究也表明,

miR-93 过表达能抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭。此外,也有大量研究表明,抑制 miR-93 表达能够抑制宫颈癌、胃癌及神经胶质瘤等肿瘤细胞的增殖、抗凋亡、侵袭及迁移能力等。miR-93 对不同肿瘤细胞的生物学影响不同,与不同肿瘤组织中 miR-93 表达也不同的研究结果相符合。提示考察 miR-93 的表达及临床意义应考虑肿瘤类型、肿瘤来源,等等,不能一概而论。

表皮生长因子受体位于细胞膜表面的糖蛋白,在宫颈癌细胞中异常活化,抑制 EGFR 活化可明显抑制宫颈癌细胞的增殖、侵袭,并促进宫颈癌细胞凋亡^[15]。此外,大量研究表明 miR-93 的靶基因有 *EGFR*、*PTEN*、*RAD1*、*FGFR2S* 及酪氨酸蛋白激酶受体 A4 (ephrin type 4 receptor 4, EphA4) 等。表皮生长因子受体信号通路在上皮恶性肿瘤包括宫颈癌中显得尤为重要。然而,EGFR 信号通路是通过何种分子机制调节肿瘤进展的,仍然知之甚少。miR-93 在多种肿瘤中呈低表达,能够激活 EGFR 信号通路,从而促使肿瘤的发生发展和侵袭转移。尽管基因芯片分析已经证实 *EGFR* 是 miR-93 的靶基因,但关于其在宫颈癌中的有关调控机制的报道仍少见。基于以上研究报道,本研究推测 miR-93 可能影响宫颈癌细胞 EGFR/AKT 信号通路活性。本实验研究分析 miR-93 过表达对宫颈癌细胞 Hela、EGFR、p-EGFR、AKT 及 p-AKT 表达的影响,结果表明过表达 miR-93 后细胞中 p-EGFR、p-AKT 表达量明显下降,但是总 AKT 和 EGFR 蛋白表达无明显变化。miR-93 通过靶向抑制 EGFR 活性,阻断 EGFR/AKT 信号通路活,从而抑制宫颈癌细胞的生物学行为。

参 考 文 献:

- [1] 特日格乐,苏尼尔,金焰. 宫颈癌分子诊断标记物的研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2014, 37(3): 12-16.
- [2] NAHVI A, SHOEMAKER C J, GREEN R. An expanded seed sequence definition accounts for full regulation of the hid 3'-UTR by bantam miRNA[J]. Rna, 2009, 15(5): 814-822.
- [3] 孙海婷. microRNA 作用靶基因的预测[J]. 科技创新与应用, 2013, 16(23): 57-58.
- [4] LIU X, SIU K, LIU S, et al. Epigenetic silencing of microRNA-199b-5p is associated with acquired chemoresistance via activation of JAG1-Notch1 signaling in cervical cancer[J]. Oncotarget, 2014, 5(4): 944-958.
- [5] PARIKH A, LEE C, JOSEPH P, et al. MicroRNA-181a has a critical role in ovarian cancer progression through the regulation

- of the epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nature Communications*, 2014, 3(5): 2977.
- [6] PETROCCA F, VECCHIONE A, CROCE C M. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor β signaling[J]. *Cancer Research*, 2008, 68(20): 8191-8194.
- [7] ZHAO Z, BAI J, ZHOU Q, et al. TSA suppresses miR-106b-93-25 cluster expression through downregulation of MYC and inhibits proliferation and induces apoptosis in human EMC[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): DOI: 10.1371/journal.pone.0045133.
- [8] XU D, HE X X, CHANG Y, et al. Downregulation of miR-93 expression reduces cell proliferation and clonogenicity of HepG2 cells[J]. *Hepato-gastroenterology*, 2011, 59(120): 2367-2373.
- [9] CHEN L, JIANG M, YUAN W, et al. Prognostic value of miR-93 overexpression in resectable gastric adenocarcinomas[J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2012, 75(1): 22-27.
- [10] LI Y, TAN W, NEO T W L, et al. Role of the miR-106b-25 microRNA cluster in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Science*, 2009, 100(7): 1234-1242.
- [11] 蔡静清, 王宁, 张敏. 非小细胞肺癌血浆 miR-223, miR-93 和 miR-218 的表达及其临床意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2014, 19(12): 1075-1080.
- [12] MONTANINI L, LASAGNA L, BARILI V, et al. MicroRNA cloning and sequencing in osteosarcoma cell lines: differential role of miR-93[J]. *Cellular oncology*, 2012, 35(1): 29-41.
- [13] 王培蓓, 曹影, 马炎雪, 等. MiR-193a-3p 对人 Hep-2 喉癌细胞增殖、凋亡及侵袭的影响[J]. *江苏医药*, 2014, 11(8): 875-878.
- [14] TANG Q, ZOU Z, ZOU C, et al. MicroRNA-93 suppress colorectal cancer development via Wnt/ β -catenin pathway down-regulating[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(3): 1701-1710.
- [15] 张爱臣, 张晓红, 冷维春, 等. EGFR 在宫颈癌中的表达及其临床意义[J]. *中国实验诊断学*, 2007, 11(2): 166-169.

(申海菊 编辑)