

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.21.002
文章编号: 1005-8982 (2022) 21-0008-05

子宫和子宫颈肿瘤专题·论著

MicroRNA-31-3p 靶向调控 Sema4C 表达对 宫颈癌顺铂耐药性的作用及其机制研究*

张华章, 黎婧, 刘智慧

[华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院(武汉市妇幼保健院) 妇一科,
湖北 武汉 430019]

摘要: **目的** 探讨人宫颈癌细胞 microRNA-31-3p (miR-31-3p) 的表达及其靶向调控 Sema4C 表达对顺铂耐药性的作用机制研究。**方法** 取对数生长期 HeLa 细胞, 分别转染 miR-31-3p mimics (miR-31-3p mimics 组)、空白质粒 (对照组), 以及在转染 miR-31-3p mimics 的基础上过表达 Sema4C (miR-31-3p mimics+Sema4C 组)。采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 miR-31-3p 的表达, Western blotting 检测转染 mimics 后 HeLa 细胞 Sema4C 蛋白的表达, CCK-8 法检测不同浓度顺铂作用下 HeLa 细胞的耐药性变化。**结果** miR-31-3p 在宫颈癌细胞 HeLa 中低表达 ($P < 0.05$)。miR-31-3p mimics 组、miR-31-3p mimics+Sema4C 组 miR-31-3p 相对表达量高于对照组 ($P < 0.05$), 且 miR-31-3p mimics 组与 miR-31-3p mimics+Sema4C 组 miR-31-3p 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。miR-31-3p mimics 组、miR-31-3p mimics+Sema4C 组 Sema4C 蛋白相对表达量低于对照组 ($P < 0.05$); miR-31-3p mimics+Sema4C 组 Sema4C 蛋白相对表达量高于 miR-31-3p mimics 组 ($P < 0.05$)。不同浓度顺铂作用下, miR-31-3p mimics 组 HeLa 细胞生存率均低于对照组 ($P < 0.05$); 2 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$ 、4 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂作用下, miR-31-3p mimics+Sema4C 组 HeLa 细胞生存率高于 miR-31-3p mimics 组 ($P < 0.05$)。**结论** miR-31-3p 靶向调控 Sema4C 表达, 降低宫颈癌细胞对顺铂的耐药性。

关键词: 宫颈癌; 耐药; microRNA-31-3p; Sema4C

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Effect of microRNA-31-3p targeted regulation of Sema4C expression on cisplatin resistance in cervical cancer and its mechanism *

Hua-zhang Zhang, Jing Li, Zhi-hui Liu

[Department of Gynecology, Wuhan Children's Hospital (Wuhan Maternal and Child Healthcare Hospital),
Tongji Medical College, Huazhong university of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430019, China]

Abstract: Objective To investigate the expression of microRNA-31-3p (miR-31-3p) in human cervical cancer cells and miR-31-3p's regulation of transmembrane signaling protein 4C (Sema4C) expression to reduce the resistance of cervical cancer cells to cisplatin. **Methods** MiR-31-3p mimics were transfected into HeLa cells, and the expression of miR-31-3p was detected with qRT-PCR. CCK-8 was used to detect the changes in drug resistance of HeLa cells. Western blotting was used to detect the expression of Sema4C in HeLa cells. **Results** MiR-31-3p was low expressed in cervical cancer cell HeLa ($P < 0.05$). Compared with the control group, the resistance of HeLa cells transfected with miR-31-3p mimics to cisplatin was significantly reduced. MiR-31-3p can directly bind to the

收稿日期: 2022-02-08

* 基金项目: 湖北省自然科学基金(No:2017CFB641)

Sema4C gene and regulate the expression of Sema4C. Up-regulating the expression of miR-31-3p can cause the expression of Sema4C to decrease. Up-regulating the expression of Sema4C can rescue the effect of up-regulating miR-31-3p. **Conclusion** MiR-31-3p targets the expression of Sema4C to reduce the cisplatin resistance of cervical cancer cells.

Keywords: uterine cervical neoplasms; drug resistance; microRNA-31-3p; sema4c

宫颈癌是排第 4 位的女性常见癌症,也是女性第二癌症致死原因,女性中发病率仅次于乳腺癌^[1]。临床上,手术、放射治疗和化学药物治疗(以下简称化疗)已被广泛用于提高宫颈癌患者的生存率。但由于原发性和继发性化疗耐药的产生,晚期宫颈癌患者的 5 年生存率仍然很低。深入研究宫颈癌患者化疗耐药发生、发展的机制,有利于提高预后水平。大量研究表明, microRNA (miRNA) 在肿瘤细胞进展过程中发挥关键作用,如癌细胞生长、凋亡和转移^[2]。MicroRNA-31-3p (miR-31-3p) 在多种癌症组织中异常表达,如结肠癌^[3]、口腔癌^[4]和脑胶质瘤^[5]。miR-31-3p 在宫颈癌中低表达,并且通过 Mirbase 数据库筛选发现 Sema4C 是 miR-31-3p 的靶基因。有研究证明, Sema4C 可调节宫颈癌上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 及对顺铂化疗的敏感性,但其相关机制尚不清楚^[6-7]。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人宫颈癌细胞系 HeLa、人正常宫颈细胞系、RPMI 1640 培养液、PCR 引物购自南京擎科生物科技有限公司, PCR 试剂盒(济南诺维赞生物科技有限公司), miR-31-3p mimics (广州锐博科技有限公司), Sema4C 过表达质粒(上海吉凯基因科技有限公司), LipofectamineTM 3000 转染试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、CCK-8 试剂(日本东仁化学科技有限公司), 抗 Sema4C、GAPDH、山羊抗兔 IgG HRP 二级抗体购自美国 Abcam 公司, BCA 蛋白分析试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 主要仪器

细胞培养培养箱、实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪 (Step One Plus)、多功能酶标仪、低温高速离心机、高速低温离心机、-80℃ 冰箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 电泳仪、转膜仪购自北京六一仪器厂, 化学发光检测仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将人宫颈癌细胞 HeLa 和人正常宫颈细胞放入 RPMI 1640 培养液, 内含 10% FBS, 100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素, 培养液放置于 37℃、5% 二氧化碳增湿培养箱中。

1.3.2 细胞转染 取对数生长期 HeLa 细胞均匀接种在 6 孔板中。将 Opti-MEM 培养基预混 LipofectamineTM 3000 试剂, 分别转染 miR-31-3p mimics (miR-31-3p mimics 组)、空白质粒 (对照组), 以及在转染 miR-31-3p mimics 的基础上过表达 Sema4C (miR-31-3p mimics + Sema4C 组) 10 ~ 15 min, 继续置于恒温培养箱中静置培养 2 ~ 3 d, 用于后续实验。

1.3.3 qRT-PCR 检测 miR-31-3p 的表达 分离并纯化 HeLa 细胞、人正常宫颈细胞总 RNA, 检测 RNA 纯度并逆转录成 cDNA, 按照 PCR 试剂盒说明书进行 qRT-PCR。反应体系: SYBER Green Mix 10 μL、正反向引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL、cDNA 2 μL、H₂O 2 μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 62℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 40 个循环, 60℃ 继续延伸 25 min。以 U6 为内参基因, 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达量。qRT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
U6	正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	17
	反向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	20
	茎环引物: 5'-TGCTATGCCAACATATTGT CATC-3'	20
miR-31-3p	正向: 5'-ACACTCCAGCTGGGTGCTATGC CAACAT-3'	28
	反向: 5'-TGCTGTCTGGAGTCG-3'	16

1.3.4 Western blotting 检测 Sema4C 蛋白的表达 收集 HeLa 细胞并在 RIPA 缓冲液中溶解。使用 BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白通过 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 并转移到硝化纤维素膜上。BSA 封闭后, 用抗 Sema4C 和

GAPDH 的一抗孵育,山羊抗兔 IgG HRP 的二抗(1:2 000)处理条带,并使用化学发光物质检测条带。

1.3.5 CCK-8 法检测细胞吸光度 取对数生长期 miR-31-3p mimics 组、对照组、miR-31-3p mimics+Sema4C 组 HeLa 细胞,消化分离并加入完全培养基重悬,制成细胞悬液,种植于 96 孔板中,每孔约 3 000 个细胞。按比例配制 1 μmol/L、2 μmol/L、3 μmol/L、4 μmol/L、5 μmol/L、6 μmol/L 顺铂。取出两组原有培养基,加入含相应浓度药物的培养基,细胞在 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱内培养 24 h。除去培养基,配制 CCK-8 工作液,每孔加入 100 μL CCK-8 溶液,细胞在培养箱内培养 1~5 h。用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度,计算细胞生存率。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 和 Graphpad Prism 8.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用 *t* 检验或方差分析,进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HeLa 细胞中 miR-31-3p 的表达

qRT-PCR 结果表明,HeLa 细胞与人正常宫颈细胞 miR-31-3p 相对表达量分别为(0.43 ± 0.32)和(1.06 ± 0.12),经 *t* 检验,差异有统计学意义(*t* = 3.193, *P* = 0.033),HeLa 细胞 miR-31-3p 低于人正常宫颈细胞。

2.2 miR-31-3p 靶向调控 Sema4C 的表达

利用生物信息学方法预测 miR-31-3p 可靶向结合 *Sema4C* 基因(见图 1)。qRT-PCR 结果表明,对照组、miR-31-3p mimics 组、miR-31-3p mimics+Sema4C 组 miR-31-3p 相对表达量分别为(1.05 ± 0.32)、(2.11 ± 0.49)和(2.08 ± 0.32),经方差分析,差异有统计学意义(*F* = 12.280, *P* = 0.001)。进一步两两比较结果:miR-31-3p mimics 组、miR-31-3p mimics+Sema4C 组 miR-31-3p 相对表达量高于对照组(*P* <

0.05);miR-31-3p mimics 组与 miR-31-3p mimics+Sema4C 组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

对照组、miR-31-3p mimics 组、miR-31-3p mimics+Sema4C 组 *Sema4C* 蛋白相对表达量分别为(1.02 ± 0.25)、(0.41 ± 0.24)和(0.66 ± 0.13),经方差分析,差异有统计学意义(*F* = 10.296, *P* = 0.002)。进一步两两比较结果:miR-31-3p mimics 组、miR-31-3p mimics+Sema4C 组 *Sema4C* 蛋白相对表达量低于对照组(*P* < 0.05);miR-31-3p mimics+Sema4C 组高于 miR-31-3p mimics 组(*P* < 0.05)。见图 2。

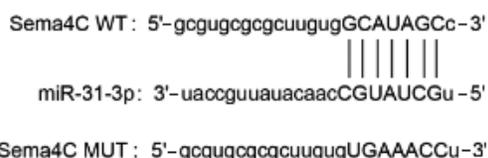
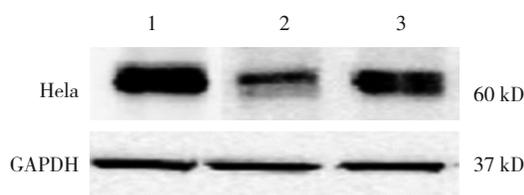


图 1 miR-31-3p 靶向结合 *Sema4C* 基因



1: 对照组; 2: miR-31-3p mimics 组; 3: miR-31-3p mimics+Sema4C 组。

图 2 HeLa 细胞中 *Sema4C* 蛋白的表达

2.3 不同浓度顺铂作用下各组 HeLa 细胞生存率比较

CCK-8 法结果表明,不同浓度顺铂作用下,对照组、miR-31-3p mimics 组、miR-31-3p mimics+Sema4C 组 HeLa 细胞生存率比较,经方差分析,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。进一步两两比较:miR-31-3p mimics 组 HeLa 细胞生存率低于对照组(*P* < 0.05);2 μmol/L、3 μmol/L、4 μmol/L、5 μmol/L 顺铂作用下,miR-31-3p mimics+Sema4C 组 HeLa 细胞生存率高于 miR-31-3p mimics 组(*P* < 0.05),表明 miR-31-3p 调控 HeLa 细胞铂类耐药,过表达 *Sema4C* 可抑制 miR-31-3p 的作用。见表 2。

表 2 不同浓度顺铂作用下各组 HeLa 细胞的生存率变化 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	1 μmol/L 顺铂	2 μmol/L 顺铂	3 μmol/L 顺铂	4 μmol/L 顺铂	5 μmol/L 顺铂	6 μmol/L 顺铂
对照组	100.00 ± 0.00	95.32 ± 7.63	83.58 ± 7.63	75.32 ± 7.63	63.25 ± 7.24	47.86 ± 6.78
miR-31-3p mimics 组	100.00 ± 0.00	76.81 ± 7.24	66.89 ± 4.38	49.86 ± 10.53	32.18 ± 2.58	27.34 ± 6.21
miR-31-3p mimics+Sema4C 组	100.00 ± 0.00	88.23 ± 3.54	76.25 ± 3.45	65.45 ± 3.45	38.23 ± 6.54	27.68 ± 5.23
<i>F</i> 值		10.622	11.755	13.656	39.961	18.510
<i>P</i> 值		0.002	0.001	0.000	0.000	0.000

3 讨论

有研究表明,宫颈癌的发生与人乳头状瘤病毒感染有关^[8]。随着宫颈癌组织的病理检查和早期诊断的加强,已显著降低了该病的发病率和病死率^[9],但宫颈癌仍然是威胁女性健康的第 2 大因素。对晚期患者,宫颈癌耐药的产生是限制患者预后的主要因素之一。目前已有大量关于宫颈癌的研究,但宫颈癌耐药发生、发展的具体机制仍不清楚。

目前越来越多的证据表明,miRNA 在多种肿瘤和其他疾病的诊断、治疗及预后中发挥重要作用^[10-11]。例如,miR-146a-5p 在多种肿瘤中异常表达,并且 miR-146a-5p 可能作为一种非侵入性生物标志物对多种肿瘤有靶向治疗有用^[12]。miR-31-3p 编码基因位于染色体 9p21.3,参与多种肿瘤细胞的发生、发展。在脑胶质瘤中,miR-31-3p 扮演了重要角色,过表达 miR-31-3p 可显著降低 MAD2L1 表达,并且通过生物信息学技术分析得出 miR-31-3p 的靶基因涉及细胞增殖、转录及肿瘤等信号通路^[5]。有研究证实,通过下调 STAT3 的表达,miR-31-3p 还可抑制横纹肌肉瘤细胞增殖和迁移^[13]。在结肠癌中,miR-31-3p 表达水平可作为西妥昔单抗对 RAS-WT mCRC 患者疗效的预测性生物标志物^[14]。同样在结肠癌中,与 miR-31-3p 高表达患者相比,在预处理活检中 miR-31-3p 低表达的患者有更高的总有效率,以及更高无进展生存率和总生存率^[3]。

本研究结果表明,miR-31-3p 在宫颈癌细胞中低表达,与多种癌症中的表达一致;上调 miR-31-3p 的表达可显著提高宫颈癌细胞对顺铂的化疗敏感性。本研究采用生物信息学技术预测了 miR-31-3p 可靶向调控 Sema4C 的表达,并进一步验证 miR-31-3p 通过靶向调控 Sema4C 的表达,影响宫颈癌细胞对顺铂的耐药性。本研究不仅探究 miR-31-3p 在宫颈癌顺铂化疗中产生耐药的机制,同时也证实 Sema4C 表达的调控机制。

Sema4C 的高表达能显著降低宫颈癌细胞对顺铂的化疗敏感性^[7]。更有研究证明, Sema4C 可促进宫颈癌细胞的侵袭和转移^[6]。Sema4C 参与多种肿瘤的发生、发展,也是许多 miRNA 的靶点,包括 miR-125b、miR-25-3p、miR-205、miR-138 及 miR-31。Sema4C 参与 EMT 介导的许多恶性肿瘤的化疗耐药,包括乳腺癌、宫颈癌、肝癌和肺癌。miR-125b 在乳

腺癌、肺癌中的异常表达和 miR-25-3p 在 CC17 中的异常表达可显著逆转 EMT 表型,并通过下调 Sema4C 表达调节疾病进展,完全缓解诱导的 EMT。有研究证明, Sema4C 可通过 p38-MAPK 影响卵巢癌细胞增殖^[15];在乳腺癌中, Sema4C 在与肿瘤相关的淋巴管内皮细胞中高表达,可介导肿瘤淋巴转移,影响乳腺癌细胞增殖,还可以作为乳腺癌的重要标志物^[16-17];在结肠癌中, Sema4C 的过度表达导致大肠癌细胞的侵袭和迁移率升高^[18];在脑胶质瘤中, Sema4C 的表达受 miR-138 靶向作用,并促进脑胶质瘤细胞侵袭和转移^[19]。这些结果都表明靶向 Sema4C 可作为逆转肿瘤化疗耐药的新途径。

综上所述,miR-31-3p 通过靶向调节 Sema4C 的表达,调控宫颈癌细胞对顺铂的耐药性。本研究为宫颈癌的治疗提供了新的靶点和理论基础。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] LI B W, GAO Y, SUN M J, et al. Expression, regulation, and function of exosome-derived miRNAs in cancer progression and therapy[J]. FASEB J, 2021; 35(10): e21916.
- [3] ANANDAPPA G, LAMPIS A, CUNNINGHAM D, et al. miR-31-3p expression and benefit from Anti-EGFR inhibitors in metastatic colorectal cancer patients enrolled in the prospective phase II PROSPECT-C trial[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(13): 3830-3838.
- [4] ZELJIC K, JOVANOVIĆ I, JOVANOVIĆ J, et al. MicroRNA meta-signature of oral cancer: evidence from a meta-analysis[J]. Ups J Med Sci, 2018, 123(1): 43-49.
- [5] 于江龙, 喀斯木·艾麦提, 阿不都拉·艾沙. miR-31-3p 脑胶质瘤靶基因预测及相关调控通路分析[J]. 新疆医学, 2021, 51(2): 145-148.
- [6] 杨丽兰. Sema4C 在宫颈癌中调节上皮间质转化及其机制研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- [7] 朱慧等. miR-532 抑制 Sema4C 逆转宫颈癌细胞上皮间质转化及增加对顺铂化疗的敏感性[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(19): 3299-3305.
- [8] YUAN Y, CAI X S, SHEN F R, et al. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer[J]. Cancer Lett, 2021, 497: 243-254.
- [9] SMITH E S, MOON A S, O'HANLON R, et al. Radical trachelectomy for the treatment of early-stage cervical cancer: a systematic review[J]. Obstet Gynecol, 2020, 136(3): 533-542.
- [10] KABEKKODU S P, SHUKLA V, VARGHESE V K, et al. Cluster miRNAs and cancer: diagnostic, prognostic and therapeutic opportunities[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2020, 11(2): e1563.

- [11] FU Z W, WANG L, LI S J, et al. MicroRNA as an important target for anticancer drug development[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 736323.
- [12] IACONA J R, LUTZ C S. miR-146a-5p: expression, regulation, and functions in cancer[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2019, 10(4): e1533.
- [13] 陈晓燕, 王教, 赵云萍, 等. miR-31-3p 对横纹肌肉瘤细胞增殖和迁移的抑制作用和机制[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(11): 2122-2130.
- [14] LAURENT-PUIG P, GRISONI M L, HEINEMANN V, et al. Validation of miR-31-3p expression to predict cetuximab efficacy when used as first-line treatment in RAS wild-type metastatic colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(1): 134-141.
- [15] 李曼琳. Sema4C 通过 p38-MAPK 通路对卵巢癌生物学特性的影响[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2020.
- [16] 乔龙. Sema4C 介导肿瘤淋巴转移和作为乳腺癌生物标志物的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2018.
- [17] GURRAPU S, PUPO E, FRANZOLIN G, et al. Sema4C/Plexin B2 signaling controls breast cancer cell growth, hormonal dependence and tumorigenic potential[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(7): 1259-1275.
- [18] ZHANG M Y, JIANG X, JIANG S M, et al. LncRNA FOXD2-AS1 regulates miR-25-3p/Sema4C axis to promote the invasion and migration of colorectal cancer cells[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 10633-10639.
- [19] 李会兵, 姚娟. miR-138 靶向作用 Sema4C 对脑胶质瘤细胞侵袭转移的影响[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2018, 45(3): 139-142.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 张华章, 黎婧, 刘智慧. MicroRNA-31-3p 靶向调控 Sema4C 表达对宫颈癌顺铂耐药性的作用及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(21): 8-12.

Cite this article as: ZHANG H Z, LI J, LIU Z H. Effect of microRNA-31-3p targeted regulation of Sema4C expression on cisplatin resistance in cervical cancer and its mechanism[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(21): 8-12.