

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.07.008

· 基础研究 ·

miR-134-5p对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响及其分子机制

汤继英^{a,b}, 蔡晓军^a, 汪选斌^{a,b}, 曹凤军^a, 佐志刚^a, 张莉^a, 熊柳鑫^a (湖北医药学院附属人民医院 a. 肿瘤中心; b. 中药药理实验室, 湖北 十堰 442000)

[摘要] **目的:** 观察微小核糖核酸-134-5p(miR-134-5p)转染对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响,验证其可能的分子机制。**方法:** 收集湖北医药学院附属人民医院肿瘤中心2016年5月至8月收治的8名宫颈癌患者肿瘤组织和相应癌旁组织。利用 lipofectamine 2000 将 miR-134-5p mimics 转染至宫颈癌Hela和SiHa细胞。采用MTT法和集落形成实验检测细胞增殖活性;流式细胞术(FCM)检测细胞周期和细胞凋亡;qRT-PCR检测宫颈癌组织和细胞miR-134-5p mRNA表达以及宫颈癌细胞EGFR mRNA表达;Western blotting检测宫颈癌细胞EGFR信号通路相关蛋白的表达。**结果:** 宫颈癌组织miR-134-5p mRNA表达显著低于癌旁组织($P<0.01$)。和转染miR-NC的Hela和SiHa细胞比较,转染miR-134-5p mimics的宫颈癌Hela和SiHa细胞miR-134-5p mRNA表达显著升高;细胞增殖能力显著降低(转染第5天,Hela细胞: 1.06 ± 0.13 vs 1.32 ± 0.07 ; SiHa细胞: 1.12 ± 0.10 vs 1.42 ± 0.12 , 均 $P<0.05$);形成的集落数减少;G0/G1期细胞比例显著上升,S期和G2/M期细胞比例显著下降;细胞凋亡率显著增加[Hela细胞: $(26.53\pm 13.48)\%$ vs $(3.25\pm 1.74)\%$; SiHa细胞: $(30.49\pm 12.04)\%$ vs $(5.10\pm 2.86)\%$,均 $P<0.05$];EGFR mRNA和EGFR蛋白表达显著下调,其中EGFR mRNA,Hela细胞下调58%($P<0.01$),SiHa细胞下调41%($P<0.05$);EGFR下游靶蛋白p-AKT、p-ERK1/2和Cyclin D1蛋白及pEGFR蛋白表达显著下调。**结论:** miR-134-5p可显著抑制宫颈癌细胞增殖并促进细胞凋亡,其可能的分子机制是通过抑制EGFR基因的表达,抑制EGFR通路的活化。

[关键词] 微小核糖核酸-134-5p;宫颈癌;增殖;凋亡;表皮生长因子受体

[中图分类号] R737.33; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)07-0742-06

Effect of miR-134-5p on proliferation and apoptosis of cervical carcinoma cell and its molecular mechanism

TANG Jiying^{a,b}, CAI Xiaojun^a, WANG Xuanbin^{a,b}, CAO Fengjun^a, ZUO Zhigang^a, ZHANG Li^a, XIONG Liuxin^a (a. Center of Oncology, b. Laboratory of Chinese Herbal Pharmacology, the Renmin Hospital, Hubei Medical College, Shiyan 442000, Hubei, China)

[Abstract] Objective: To observe effect of miR-134-5p transfection on proliferation and apoptosis of cervical carcinoma cell and to verify its possible molecular mechanism. **Methods:** Eight pairs of cervical cancer and para-cancerous tissues from the patients with cervical cancer who hospitalized in Center of Oncology, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine during May to August 2016 were collected. miR-134-5p mimics were transfected into cervical carcinoma Hela and SiHa cells by lipofectamin 2000. MTT and colony formation assays were used to detect proliferation of cells. Flow cytometry (FCM) assay was used to test cell cycles and apoptosis of cells. Expressions of miR-134-5p mRNA in cervical carcinoma tissue and cell, and expression of EGFR mRNA in cervical carcinoma cell were detected by qRT-PCR assay. Expressions of EGFR pathway-related proteins in cervical carcinoma cell

[基金项目] 湖北省教育厅科学技术研究资助项目(No.B2016139),湖北省高校优秀中青年创新基金资助项目(No.T201510)。Project supported by the Scientific Technology Research Foundation of Hubei Provincial Education Department (No. B2016139) and Innovative Foundation for Excellent Young and Middle-aged Talents in Universities of Hubei Province (No. T201510)

[作者简介] 汤继英(1982-),女,硕士生,副主任医师,主要从事妇科肿瘤放、化疗和妇科肿瘤治疗中miRNA作用的研究,E-mail: 2304638987@qq.com

[通信作者] 蔡晓军(CAI Xiaojun, corresponding author),主任医师,副教授,硕士生导师,主要从事恶性肿瘤治疗中miRNA作用的研究,E-mail: caixj88888@sina.com;曹凤军(CAO Fengjun, co-corresponding author),主任医师,副教授,硕士生导师,主要从事恶性肿瘤治疗中miRNA作用的研究,E-mail: sycfj016@163.com

were examined by Western blotting assay. **Results:** Expression of miR-134-5p mRNA in cervical carcinoma tissue was significantly lower than that in para-carcinoma tissue ($P<0.01$). Comparing with the HeLa and SiHa cells that transfected with miR-NC, expressions of miR-134-5p mRNA in the HeLa and SiHa cells that transfected with miR-134-5p mimics were obviously increased, proliferation abilities of the cells significantly reduced (at the 5th day of the transfection, HeLa cell: 1.06 ± 0.13 vs 1.32 ± 0.07 ; SiHa cell: 1.12 ± 0.10 vs 1.42 ± 0.12 , all $P<0.05$), apoptosis rates of the cells obviously increased (HeLa cell: $[26.53\pm 13.48]\%$ vs $[3.25\pm 1.74]\%$; SiHa cell: $[30.49\pm 12.04]\%$ vs $[5.12\pm 2.86]\%$, all $P<0.05$), number of formed colony decreased, ratio of G0/G1 phase cells increased, ratio of the cells in S and G2/M phase decreased, apoptosis rate of the cells enhanced (all $P<0.05$), expressions of EGFR mRNA and EGFR protein in the cells were remarkably down-regulated, among which EGFR mRNA in the the HeLa cell down 58% ($P<0.01$) and in the the SiHa cell down 41% ($P<0.05$), expressions of downstream target protein for EGFR, p-AKT, p-ERK/2 and Cyclin D1, as well as pEGFR proteins were evidently down-regulated. **Conclusion:** miR-134-5p could significantly inhibit proliferation of the cervical carcinoma cells and promote their apoptosis, of which possible molecular mechanism might be inhibit activation of EGFR pathway through inhibiting expression of EGFR gene.

[Key words] micro ribonucleic acid-134-5p (miR-134-5p); cervical carcinoma; proliferation; apoptosis; epidermal growth factor receptor (EGFR)

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(7): 742-747. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.07.008]

miRNAs 是一类内源性非编码 RNA 分子,长度约为 22 个核苷酸,通过转录后水平调控,广泛参与细胞的增殖、分化、衰老、凋亡等多种功能,与肿瘤的发生发展密切相关^[1-2]。有研究^[3-5]表明,miR-134-5p 可抑制胃癌、肺癌、乳腺癌的生长。但其在宫颈癌发生发展中的作用尚不明确。本研究通过观察 miR-134-5p 高表达对宫颈癌细胞增殖、凋亡的影响,并探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

宫颈癌细胞系 HeLa 和 SiHa 购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;miR-134-5p 模拟物(mimics)、miR-NC 及相关引物(表 1)由上海吉凯基因化学技术有限公司合成,RPMI-1640 培养基、胎牛血清购于美国 Gibco 公司,lipofectamine 2000 购于美国 Invitrogen 公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于美国 Sigma 公司,Annexin V-FICT/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购于上海鑫乐生物科技有限公司,qRT-PCR 相关试剂购于日本 TaKaRa 公司;引物购于上海生物工程股份有限公司(表 1),本实验所用抗体均购于美国 CST 公司。

1.2 样本收集

收集湖北医药学院附属人民医院肿瘤中心 2016 年 5 月至 2016 年 8 月宫颈癌患者的 8 对肿瘤组织和相应的癌旁组织,所有患者术前均未接受任何放疗或化疗,患者年龄均大于 18 岁。所有组织样本收集

后立即使用液氮冷冻后保存于 -80℃ 冰箱中。

1.3 miRNA 设计及结合位点

miR-134-5p 序列为 5'-UGUGACUGGUUGAC-CAGAGGGG-3',与 EGFR 结合位点如图 1。miR-NC 序列为 5'-UUCUGCCGCGGUGCCACGUTT-3'。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Tab. 1 Sequence of qRT-PCR primer

Primer	Sequences
<i>GAPDH</i>	
Forward	5'-TCCCATCACCATCTTCCA-3'
Reverse	5'-CATCACGCCACAGTTTCC-3'
<i>EGFR</i>	
Forward	5'-AGGCACGAGTAACAAGCTCAC-3'
Reverse	5'-ATGAGGACATAACCAGCCACC-3'

1564: 5'agCCUACAGUUAUGUUCAGUCACa3' EGFR 3'UTR
 ||| ||:| :|||
 3'ggGGAGACCAGU--UGGUCAGUGu 5' hsa-miR-134-5p
 mirSVR score:-1.0627; Phast cone soore: 0.5561

图 1 miR-134-5p 与 EGFR mRNA 3'UTR 结合位点

Fig. 1 Combining site of miR-134-5p and EGFR mRNA3'UTR

1.4 细胞培养及转染

将宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞接种于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中,于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。按照 Li-

pofectamine™ 2000 转染说明书操作, 将 miR-134-5p mimics 和 miR-NC 分别转染 HeLa 和 SiHa 细胞, 即 HeLa 细胞转染 miR-134-5p mimics 的实验组 (miR-134-5p mimics+HeLa 组) 及转染 miR-NC 的对照组 (miR-NC+HeLa 组) 和 SiHa 细胞转染 miR-134-5p mimics 的实验组 (miR-134-5p mimics+SiHa 组) 及转染 miR-NC 的对照组 (miR-NC + SiHa 组) 共 4 个组。

1.5 流式细胞术检测转染细胞的细胞周期

宫颈癌细胞转染 48 h 后, 胰酶溶液消化收集细胞; PBS 溶液洗 3 次, 离心弃上清, 采用 70% 乙醇重悬细胞, 在 4℃ 下固定 18 h; 离心收集细胞, PBS 溶液洗 2 次, 离心弃上清, 采用含 RNA 酶的 PI 染液 400 μl 重悬细胞, 避光孵育 1 h, 流式细胞仪检测细胞周期。

1.6 MTT 法检测转染细胞的增殖能力

将转染 24 h 的细胞加入 96 孔细胞培养板 (5 000 个/孔), 分别于第 1、2、3、4 和 5 天, 每孔加入 20 μl MTT, 37℃ 下孵育 4 h, 小心吸去上清。每孔加入 150 μl 二甲基亚砷, 振荡 15 min, 使结晶充分溶解。在酶标仪波长 490 nm 处测定 D 值。每组设 3 个复孔。

1.7 集落形成实验统计宫颈癌细胞集落数

转染后 24 h, 0.25% 胰酶消化收集细胞, 将细胞吹打成单细胞并计数, 加入 6 孔板中 (1 000 个/孔), 振荡均匀, 细胞培养箱内连续培养, 10 d 后结晶紫染色, 固定、晾干、拍照, 计算宫颈癌细胞集落形成数。

1.8 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

转染实验后 48 h, 使用胰酶消化收集细胞, 按照 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒说明书操作, 流式细胞仪检测转染细胞的凋亡率。

1.9 qRT-PCR 检测宫颈癌患者组织和各组细胞中 miR-134-5p 的表达量及各组细胞中 EGFR mRNA 的表达

按照 TRIzol 说明书操作分别提取宫颈癌及癌旁组织和各组细胞总 RNA, 逆转录后进行 qRT-PCR 扩增检测。miRNA 检测以 U6 为内参, 扩增条件: 95℃ 10 s, 60℃ 20 s, 72℃ 10 s, 共 40 个循环。mRNA 检测以 GAPDH 为内参, 扩增条件: 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环。最终被检物表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

1.10 Western blotting 检测 EGFR 信号通路相关蛋白的表达

收集转染 48 h 后的两组细胞, 提取细胞总蛋白, 分别取 40 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE, 转至硝酸纤维素膜上, 分别用抗 α-Tubulin、EGFR、pEGFR、p-AKT、p-ERK1/2 及 Cyclin D1 一抗和含辣根过氧化物酶标

记的二抗孵育, 化学显影剂显影。

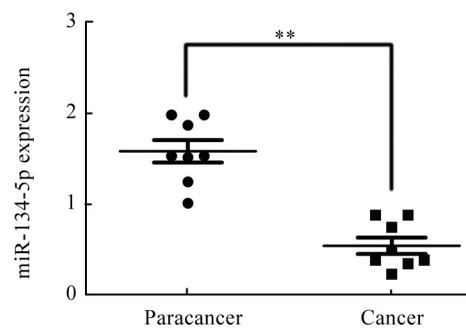
1.11 统计学处理

应用 SPSS19.0 统计软件分析数据。计量数据以 () 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

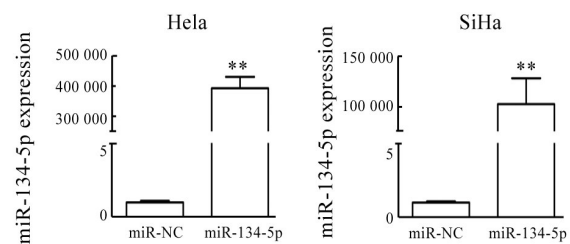
2.1 miR-134-5p 在宫颈癌组织表达降低, 在转染 miR-134-5p mimics 的宫颈癌细胞表达升高

qRT-PCR 检测结果 (图 2) 显示, 8 例患者宫颈癌组织 miR-134-5p 的表达显著低于癌旁组织 (0.54 ± 0.26 vs 1.58 ± 0.35 , $t = 6.699$, $P < 0.01$); 宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞 miR-134-5p mimics 组 miR-134-5p 表达显著高于 miR-NC 组 [(HeLa 细胞: $394\ 383.6 \pm 76\ 405.75$ vs 1.02 ± 0.23 , $t = 10.320$, $P < 0.01$); (SiHa 细胞: $102\ 389.43 \pm 52\ 019.24$ vs 1.01 ± 0.16 , $t = 3.937$, $P < 0.01$)] (图 3)。



** $P < 0.01$ vs para-carcinoma tissue

图 2 肿瘤及癌旁组织中 miR-134-5p 表达量检测
Fig. 2 Expressions of miR-134-5p in the carcinoma and para-carcinoma tissues



** $P < 0.01$ vs miR-NC group

图 3 各组 HeLa 细胞和 SiHa 细胞 miR-134-5p 表达量
Fig. 3 Expressions of miR-134-5p in the HeLa and the SiHa cells of the various groups

2.2 转染 miR-134-5p mimics 后宫颈癌细胞增殖能力降低

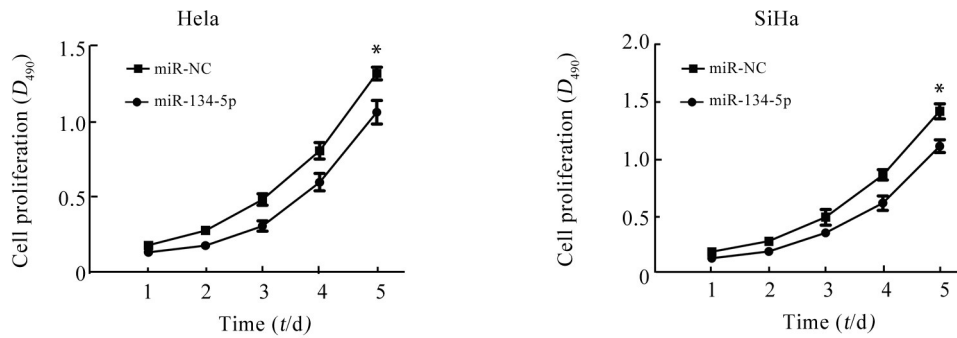
MTT 检测结果 (图 4) 显示, 转染第 5 天, 转染

miR-134-5p mimics 的 miR-134-5p 组 HeLa 细胞和 SiHa 细胞增殖能力比 miR-NC 组显著降低(HeLa 细胞: 1.06 ± 0.13 vs 1.32 ± 0.07 ; SiHa 细胞: 1.12 ± 0.10 vs 1.42 ± 0.12 , 均 $P < 0.05$)。

2.3 转染 miR-134-5p mimics 后宫颈癌细胞集落形成

能力降低

集落形成实验结果(表 2 和图 5)显示,转染 miR-134-5p mimics 的 miR-134-5p 组宫颈癌 HeLa 细胞和 SiHa 细胞形成的集落数比对照 miR-NC 组显著减少 ($P < 0.05$)。



* $P < 0.05$ vs miR-134-5p group

图 4 MTT 检测各组宫颈癌细胞增殖情况

Fig. 4 Proliferation status of the cervical carcinoma cells in the various groups detected by MTT assay

2.4 转染 miR-134-5p mimics 的宫颈癌细胞周期受到阻滞和细胞凋亡率增加

流式细胞术检测细胞周期结果(表 3)显示,与 miR-NC 组相比,miR-134-5p 组 HeLa 和 SiHa 细胞中 G0/G1 期细胞比例显著上升,S 期和 G2/M 期细胞比

例显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测细胞凋亡率结果(表 2)显示,miR-134-5p 组较 miR-NC 组凋亡率显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),miR-134-5p 的高表达促进宫颈癌细胞凋亡。

表 2 miR-134-5p 对宫颈癌细胞集落形成能力及细胞凋亡率的影响 [$n=4, (\bar{x} \pm s)\%$]

Tab. 2 Effect of miR-134-5p on colony forming ability and apoptosis rate of the cervical carcinoma cells [$n=4, (\bar{x} \pm s)\%$]

Group	HeLa		SiHa	
	Colony rate	Apoptosis rate	Colony rate	Apoptosis rate
miR-NC	1.97 ± 0.47	3.25 ± 1.74	2.10 ± 0.45	5.10 ± 2.86
miR-134-5p	0.91 ± 0.26	26.53 ± 13.48	1.13 ± 0.39	30.49 ± 12.04
<i>t(p)</i>	$3.982(0.007)$	$3.425(0.014)$	$3.262(0.017)$	$4.105(0.006)$

表 3 miR-134-5p 对宫颈癌细胞周期的影响 [$n=4, (\bar{x} \pm s)\%$]

Tab. 3 Effect of miR-134-5p on cell cycle of the cervical carcinoma cells [$n=4, (\bar{x} \pm s)\%$]

Group	HeLa			SiHa		
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
miR-NC	49.50 ± 5.64	30.18 ± 3.88	20.32 ± 3.5	47.49 ± 7.13	31.57 ± 4.37	20.94 ± 3.93
miR-134-5p	71.16 ± 6.95	18.55 ± 3.47	10.29 ± 3.86	67.33 ± 6.03	22.63 ± 3.91	10.03 ± 5.95
<i>t(p)</i>	$4.837(0.003)$	$4.469(0.004)$	$3.850(0.009)$	$4.249(0.005)$	$3.047(0.023)$	$3.060(0.022)$

2.5 转染 miR-134-5p mimics 细胞 EGFR 基因 mRNA 和蛋白的表达下降

qRT-PCR(图 6)和 Western blotting 检测结果(图

7)均显示,miR-134-5p 组 EGFR mRNA 和蛋白表达显著下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中 EGFR mRNA HeLa 细胞下调 58% ($P < 0.01$), SiHa 细胞下调 41% ($P <$

0.05)。与 miR-NC 组相比, miR-134-5p 组 EGFR 下游靶蛋白 p-AKT、p-ERK1/2 和 Cyclin D1 蛋白及 pEGFR 蛋白表达显著下调(图 7)。

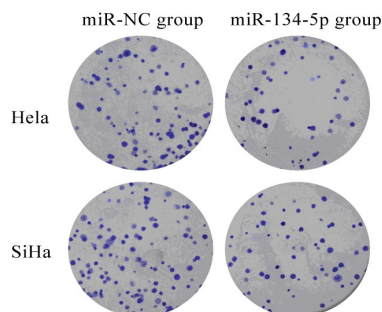
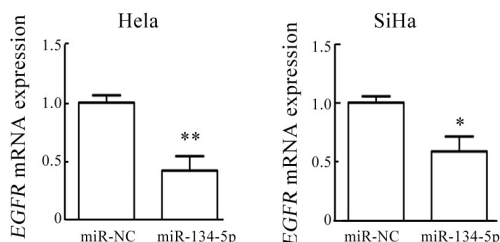
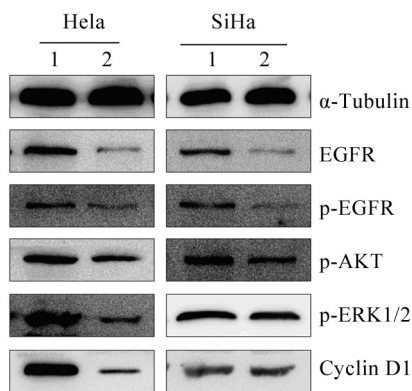


图 5 各组宫颈癌细胞形成的集落
Fig. 5 Formed colony of the cervical carcinoma cells in the various groups



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs miR-NC group

图 6 各组宫颈癌细胞中 EGFR mRNA 相对表达量
Fig. 6 Relative expressions of EGFR mRNA in the cervical carcinoma cells of the various groups



1: miR-NC; 2: miR-134-5p

图 7 Western blotting 检测 EGFR 信号通路相关蛋白的表达
Fig. 7 Expressions of EGFR signaling pathway-related proteins in the cervical carcinoma cells of the various groups detected by Western blotting

3 讨论

miRNA 是一类长度约 19~25 个核苷酸的非编码

单链 RNA 分子,通过靶向作用于靶基因 mRNA 的 3' UTR 区域发挥翻译抑制作用^[6]。miRNA 广泛参与各种细胞功能变化,其低表达或高表达均可导致多种疾病包括肿瘤的发生发展。几乎全部肿瘤细胞中均可检测到 miRNA 的异常表达,基于 miRNA 的靶向治疗已成为近年来肿瘤治疗研究的热点^[7-8]。已证实 miR-134-5p 在肿瘤的发生发展中发挥重要作用,抑制多种肿瘤如结直肠癌、肝癌、肾癌等肿瘤细胞的增殖或迁移、侵袭能力^[9-11]。但其在宫颈癌中的作用尚未明确,本研究发现,临床患者宫颈癌组织中 miR-134-5p 的表达量较癌旁组织明显降低。

通过将 miR-134-5p mimics 转染宫颈癌细胞发现,宫颈癌细胞周期明显受到抑制,位于 G0/G1 期的细胞比例明显上升;细胞的增殖能力明显下降,同时细胞凋亡显著增加。有研究^[3]表明,miR-134-5p 可显著抑制肺癌细胞中表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)的表达。EGFR 属于 I 型酪氨酸激酶 ErbB 家族,是一种重要的跨膜受体^[12]。活化 EGFR 信号通路可促进肿瘤细胞周期进展、抑制细胞凋亡、增强细胞增殖能力,参与肿瘤的发生发展^[13]。磷酸化 EGFR (p-EGFR)是 EGFR 的活性形式^[7]。本研究发现,转染 miR-134-5p mimics 的宫颈癌细胞中 EGFR、pEGFR 蛋白及下游靶蛋白 p-AKT、p-ERK1/2 和 Cyclin D1 的表达明显下调。p-AKT 和 p-ERK1/2 异常高表达可促进肿瘤细胞的增殖,抑制细胞凋亡^[14-15]。Cyclin D1 是细胞 G1 期到 S 期重要的调控因子,驱动细胞由 G1 期进入 S 期^[16]。宫颈癌组织中 miR-134-5p 的表达情况尚未见报道,本课题组下一步将通过收集宫颈癌临床资料,观察宫颈癌和癌旁组织 miR-134-5p 的表达情况,并分析患者的生存情况,探究 miR-134-5p 的表达水平与宫颈癌患者预后的相关性。有研究^[16-17]通过 miRNA 靶基因预测软件 TargetScan 和 miRecords 发现 miR-134-5p 的靶基因包括整合素分子 $\beta 1$ (integrin-beta 1, ITGB1), ITGB1 属于整合素家族 β 亚单位成员,可促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并显著抑制肿瘤细胞凋亡。miR-134-5p 对宫颈癌细胞中 ITGB1 蛋白的表达有无影响,是否能通过靶向作用于 ITGB1 蛋白,抑制宫颈癌细胞的生长是本课题组下一步研究的重点。

总之,本研究发现转染 miR-134-5p 的宫颈癌细胞增殖能力明显下降,细胞凋亡显著增加,其可能的分子机制为 miR-134-5p 抑制 EGFR 信号通路的活化,这为宫颈癌的靶向治疗提供了新思路。

