

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.10.003

· 基础研究 ·

lncRNA FOXD2-AS1 通过靶向 miR-506-5p 调控宫颈癌细胞增殖与凋亡

王婷¹, 郭朋², 曹爱娥¹ (1. 海南妇产科医院 妇产科, 海南 海口 570100; 2. 中山大学附属第一医院 妇产科, 广东 广州 510030)

[摘要] **目的:** 探讨长链非编码RNA(lncRNA)FOXD2-AS1 是否通过靶向 miR-506-5p 调控宫颈癌细胞增殖和凋亡。**方法:** 体外培养人宫颈癌细胞系 HeLa、Siha、Caski 与正常宫颈细胞株 Ect1/E6E7, 用 qPCR 检测细胞中 FOXD2-AS1 和 miR-506-5p 的表达水平。用脂质体转染技术分别构建抑制 FOXD2-AS1 表达和过表达 miR-506-5p 的宫颈癌细胞, 用 MTT 实验和流式细胞术检测细胞的增殖和凋亡情况, WB 实验检测细胞中增殖相关蛋白 CyclinD1、p21 和 p27 及凋亡相关蛋白 Bcl-2、BAX 和 cleaved-caspase-3 的表达。用双荧光素酶报告基因实验验证 FOXD2-AS1 是否靶向 miR-506-5p, 并分析同时抑制 FOXD2-AS1 和 miR-506-5p 表达对宫颈癌细胞增殖与凋亡的影响。**结果:** 与 Ect1/E6E7 细胞比较, 宫颈癌 HeLa、Siha 和 Caski 细胞中 FOXD2-AS1 表达水平显著升高, miR-506-5p 表达水平降低(均 $P < 0.01$)。抑制 FOXD2-AS1 表达可显著抑制宫颈癌细胞中 CyclinD1 蛋白和 Bcl-2 蛋白表达, 并促进 p21、p27 和 BAX、cleaved-caspase-3 蛋白的表达, 抑制细胞增殖并促进细胞凋亡(均 $P < 0.01$)。过表达 miR-506-5p 可显著抑制宫颈癌细胞中 CyclinD1 和 Bcl-2 蛋白表达, 促进 p21 和 BAX 蛋白表达, 抑制细胞增殖并促进细胞凋亡(均 $P < 0.01$)。双荧光素酶报告基因实验证实宫颈癌细胞中 FOXD2-AS1 靶向负调控 miR-506-5p 的表达 ($P < 0.01$)。抑制 miR-506-5p 表达逆转了抑制 FOXD2-AS1 表达对宫颈癌细胞增殖和凋亡的作用 ($P < 0.01$)。**结论:** FOXD2-AS1 通过靶向 miR-506-5p 的表达调控宫颈癌细胞的增殖和凋亡。

[关键词] 宫颈癌; 长链非编码 RNA FOXD2-AS1; miR-506-5p; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R737.33; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)10-1068-07

lncRNA FOXD2-AS1 regulates proliferation and apoptosis of cervical cancer cells via targeting miR-506-5p

WANG Ting¹, GUO Peng², CAO Aie¹ (1. Department of Obstetrics and Gynecology, Hainan Obstetrics and Gynecology Hospital, Haikou 570100, Hainan, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510030, Guangdong, China)

[Abstract] Objective: To investigate whether long non-coding RNA (lncRNA) FOXD2-AS1 targets miR-506-5p to regulate proliferation and apoptosis of cervical cancer cells. **Methods:** Human normal cervical cells Ect1/E6E7 and cervical cancer cell lines (HeLa, Siha and Caski) were cultured *in vitro*, and the expression levels of FOXD2-AS1 and miR-506-5p in cells were detected by qPCR. The cervical cancer cells with FOXD2-AS1 knockdown and miR-506-5p over-expression were constructed by liposome transfection technology, and the proliferation and apoptosis of cells were detected by MTT assay and flow cytometry respectively, the expression of proliferation-related proteins CyclinD1, p21, p27 and apoptosis-related proteins Bcl-2, BAX, cleaved-caspase-3 were detected by WB. Dual luciferase reporter assay was used to verify whether FOXD2-AS1 would target miR-506-5p; and the effects of simultaneous inhibition of FOXD2-AS1 and miR-506-5p on proliferation and apoptosis of cervical cancer cells were also analyzed. **Results:** Compared with Ect1/E6E7 cells, the expression of FOXD2-AS1 significantly increased while the expression of miR-506-5p significantly decreased in cervical cancer HeLa, Siha and Caski cells (all $P < 0.01$). FOXD2-AS1 knockdown significantly inhibited the protein expressions of CyclinD1, Bcl-2 and cell proliferation in cervical cancer cells, but promoted the protein expressions of p21, p27, BAX, cleaved-caspase-3, and cell apoptosis (all $P < 0.01$). miR-506-5p over-expression significantly inhibited the protein expressions of CyclinD1, Bcl-2 and cell proliferation in cervical cancer cells, but promoted the protein expressions of p21, BAX, and cell apoptosis (all $P < 0.01$). Dual luciferase reporter gene assay confirmed that FOXD2-AS1 negatively regulated the expression of miR-506-5p in cervical cancer cells ($P < 0.01$). Inhibition of miR-506-5p expression reversed the effect of FOXD2-AS1 knockdown on proliferation and apoptosis

[基金项目] 广东省中医药局科研项目(No.20173031)。Project supported by the Science Research Program from Traditional Chinese Medicine Bureau of Guangdong Province(No. 20173031)

[作者简介] 王婷(1984-),女,本科,主治医师,主要从事妇科肿瘤的基础与临床研究,E-mail:tib3057@163.com

[通信作者] 曹爱娥(CAO Aie, corresponding author),本科,副主任医师,主要从事妇科肿瘤的研究,E-mail:aiecao@126.com

of cervical cancer cell ($P < 0.01$). **Conclusion:** FOXD2-AS1 modulates proliferation and apoptosis of cervical cancer cells by negatively regulating the expression of miR-506-5p.

[Key words] cervical cancer; lncRNA FOXD2-AS1; miR-506-5p; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(10): 1068-1074. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.10.003]

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA, 其表达失调是肿瘤发生发展的重要因素^[1]。lncRNA FOXD2-AS1 是近年来新发现的具有促瘤作用的 lncRNA, 已有研究^[2-4]表明, FOXD2-AS1 在卵巢癌、胃癌、膀胱癌中高表达, 与肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及肿瘤预后不良有关, 可作为肿瘤治疗及预后判断的潜在靶点。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长约 18~25 个核苷酸的小分子非编码 RNA, 通过作用于靶基因参与调控细胞增殖、凋亡及肿瘤发生发展等多种生理病理过程^[5]。miR-506 是一种肿瘤相关 miRNA, 在宫颈癌组织中低表达且与肿瘤分化程度和淋巴结转移有关, 并可作为抑癌基因抑制宫颈癌细胞的增殖^[6-7]。本课题组通过生物信息学软件预测 miR-506-5p 可能是 FOXD2-AS1 的靶基因, 但目前 FOXD2-AS1 在宫颈癌中的表达及其是否通过靶向调控 miR-506-5p 影响宫颈癌细胞增殖和凋亡尚未可知。因此, 本研究通过检测 FOXD2-AS1 和 miR-506-5p 在宫颈癌中的表达及其对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响, 探讨其潜在的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人宫颈癌细胞系 HeLa、Siha、Caski 和正常宫颈癌细胞株 Ect1/E6E7 由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供。

胎牛血清 (Gibco 公司), DMEM 培养基 (Hyclone 公司), Lipofectamine™2000 转染试剂 (上海加科生物科技有限公司), TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司), MTT 试剂和二甲基亚砷 (APEX-BIO 公司), Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (北京索莱宝生物科技有限公司), RIPA 裂解液 (碧云天生物技术研究所)。小干扰 RNA (siRNA) 及 FOXD2-AS1 siRNA (si-FOXD2-AS1)、miRNA-mimics 及 miR-506-5p-mimics、miRNA-inhibitor 及 miR-506-5p-inhibitor 由武汉伯远生物科技有限公司合成, CyclinD1、p21、p27、Bcl-2、BAX 蛋白一抗及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (北京奥维亚生物技术有限公司), cleaved-caspase-3 蛋白抗体 (上海艾博抗公司)。

1.2 细胞培养、转染与分组

将 Ect1/E6E7、HeLa、Siha、Caski 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 37 °C、

5%CO₂、湿度 80%~90% 的培养箱中培养。次日更换培养液, 细胞生长至 80%~90% 汇合度时加入胰酶消化细胞, 进行传代培养。

取对数生长期的宫颈癌细胞, 以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 待细胞汇合度达 70% 时, 随机将细胞分为 8 组: si-NC 组 (转染 siRNA 阴性对照)、si-FOXD2-AS1 组 (转染 siRNA-FOXD2-AS1)、miR-NC 组 (转染 miRNA-mimics 阴性对照)、miR-506-5p mimics 组 (转染 miR-506-5p mimics)、si-FOXD2-AS1+anti-miR-NC (共同转染 siRNA-FOXD2-AS1 和 miRNA-inhibitor 阴性对照)、si-FOXD2-AS1+anti-miR-506-5p (共同转染 siRNA-FOXD2-AS1 和 miR-506-5p inhibitor)。每组设置 6 个重复孔, 细胞转染方法参照 Lipofectamine™2000 转染试剂说明书, 转染 48 h 后检测转染效率。

1.3 qPCR 检测宫颈癌细胞中 FOXD2-AS1 和 miR-506-5p 的表达

取生长状态良好的 Ect1/E6E7、HeLa、Siha、Caski 细胞及稳定转染的各组宫颈癌细胞, 加入 TRIzol 试剂抽提总 RNA, 分光光度计测定 RNA 纯度和浓度, 同时进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。用 TaKaRa 逆转录试剂盒合成 cDNA, 以 GAPDH 和 U6 为内参基因采用染料法进行 qPCR 反应。引物序列: FOXD2-AS1 F 为 5'-TGGACCTAGCTGCAGCTCCA-3', R 为 5'-AGTTGAAGGTGCACACACTG-3'; GAPDH F 为 5'-GCGAGATCGCACTCATCATCT-3', R 为 5'-TCAGTGGTGGACCTGACC-3'; miR-506-5p F 为 5'-TGCGGTAAGGCACCCTTCTGAGTAG-3', R 为 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'; U6 F 为 5'-TGCGGGTGCTCGCTTGGCAGC-3', R 为 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'。PCR 反应: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 FOXD2-AS1 和 miR-506-5p 的相对表达水平。

1.4 MTT 实验检测宫颈癌细胞的增殖能力

将稳定转染的各组宫颈癌细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 分别于培养 24、48 和 72 h 时加入 MTT 试剂 (20 μ l/孔), 培养 4 h 后吸去上清并加入二甲基亚砷 150 μ l 反应 15 min。酶标仪检测各孔波长 490 nm 处的光密度 (D) 值。

1.5 Annexin V-FITC 和 PI 染色流式细胞术检测宫颈癌细胞的凋亡

收集稳定转染的各组宫颈癌细胞以 1×10^5 个/孔

接种于96孔板中,培养72 h后收集细胞,调整细胞密度至 1×10^6 个/ml,加入流式管中, $1\ 000 \times g$ 离心5 min,弃上清,用预冷的PBS溶液洗涤细胞2次。重悬于 $1 \times$ 结合缓冲液中,分别依次加入Annexin V-FITC染色10 min及PI染色5 min,上流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

1.6 WB检测宫颈癌细胞增殖和凋亡相关蛋白的表达

收集稳定转染的各组宫颈癌细胞,加入RIPA裂解液提取总蛋白,BCA法测定蛋白样品浓度,将50 μ g蛋白样品与上样缓冲液混合后 $100\ ^\circ\text{C}$ 下变性3 min,进行SDS-PAGE,湿转法将分离蛋白转移至NC膜后,入封闭液中封闭1 h,洗膜,加入CyclinD1(1:1 000)、p21(1:1 000)、p27(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、BAX(1:2 000)和cleaved-capase-3(1:2 000)抗体一抗, $4\ ^\circ\text{C}$ 下孵育过夜。次日洗膜,加入HRP标记的相应二抗(1:2 000),室温下孵育2 h。洗膜后,放入ECL显色液中显色15 min,紫外凝胶成像系统中曝光、拍照,应用Image Pro Plus软件分析蛋白条带的灰度值,以GAPDH为对照计算目的蛋白的相对表达水平。

1.7 双荧光素酶报告基因实验验证FOXD2-AS1与

miR-506-5p的靶向关系

为证实FOXD2-AS1是否靶向miR-506-5p,将FOXD2-AS1的3'UTR和突变3'UTR构建荧光素酶报告基因载体,与miR-506-5p-mimics共转染宫颈癌细胞,转染36 h后收获细胞,参照荧光素酶检测试剂盒说明书检测细胞中荧光素酶活性。

1.8 统计学处理

1.3~1.7实验均重复3次。采用SPSS19.0统计学软件处理实验数据,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据采用独立样本 t 检验,多组差异比较采用单因素方差分析,组间比较采用LSD- 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 宫颈癌细胞中FOXD2-AS1高表达而miR-506-5p低表达

qPCR检测结果(图1)显示,与人正常宫颈Ect1/E6E7细胞比较,宫颈癌HeLa、Siha、Caski细胞中FOXD2-AS1表达水平明显升高($F=142.43, P < 0.01$;图1A),miR-506-5p表达水平明显降低($F=616.16, P < 0.01$;图1B)。

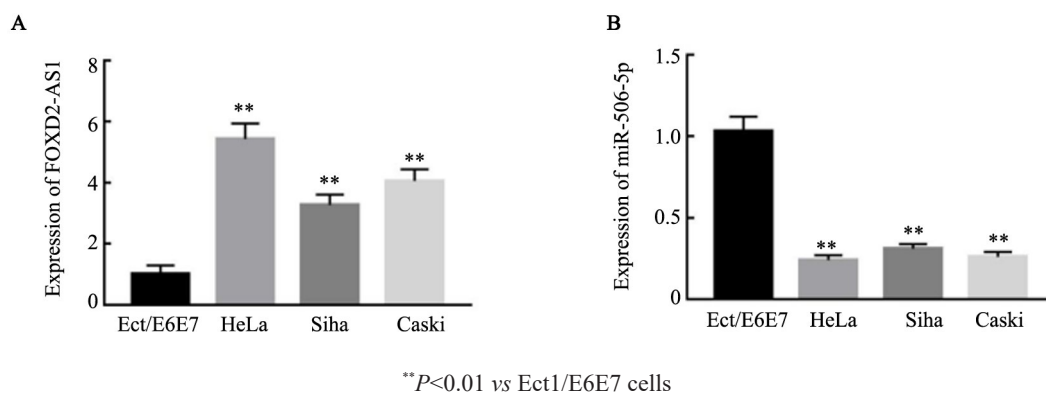


图1 人宫颈癌细胞和正常宫颈细胞中FOXD2-AS1(A)和miR-506-5p(B)表达

Fig.1 Expression of FOXD2-AS1 (A) and miR-506-5p (B) in human cervical cancer cells and normal cervical cells

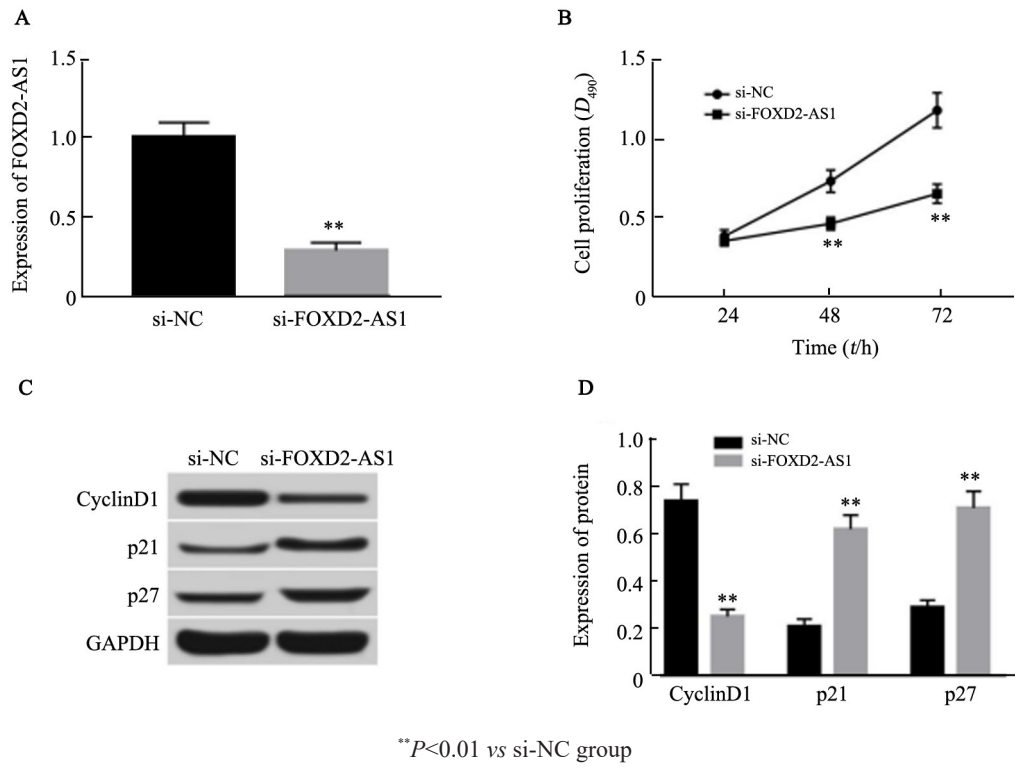
2.2 抑制FOXD2-AS1表达降低HeLa细胞的增殖能力

qPCR检测结果(图2A)显示,与si-NC组比较,si-FOXD2-AS1组宫颈癌HeLa细胞中FOXD2-AS1相对表达水平降低($t=16.713, P < 0.01$)。MTT实验结果(图2B)显示,与si-NC组比较,si-FOXD2-AS1组HeLa细胞培养48和72 h时增殖能力显著降低($t=5.582, 13.634$, 均 $P < 0.01$)。WB实验结果(图2C、D)显示,与si-NC组比较,si-FOXD2-AS1组细胞中CyclinD1蛋白表达水平降低($t=18.610, P < 0.01$)、p21和p27蛋白表达水平升高($t=17.441, 17.726$, 均 $P <$

0.01)。实验结果表明,抑制FOXD2-AS1表达明显抑制宫颈癌HeLa细胞增殖。

2.3 抑制FOXD2-AS1表达促进HeLa细胞的凋亡

Annexin V-FITC和PI染色流式细胞术检测结果(图3A、B)显示,与si-NC组比较,si-FOXD2-AS1组宫颈癌HeLa细胞的凋亡率显著升高($t=18.973, P < 0.01$)。WB实验结果(图3C、D)显示,宫颈癌细胞中Bcl-2蛋白表达水平显著降低($t=47.162, P < 0.01$),BAX蛋白和cleaved-capase-3蛋白表达水平显著升高($t=15.659, 18.544$, 均 $P < 0.01$)。实验结果表明,抑制FOXD2-AS1表达明显促进宫颈癌HeLa细胞凋亡。

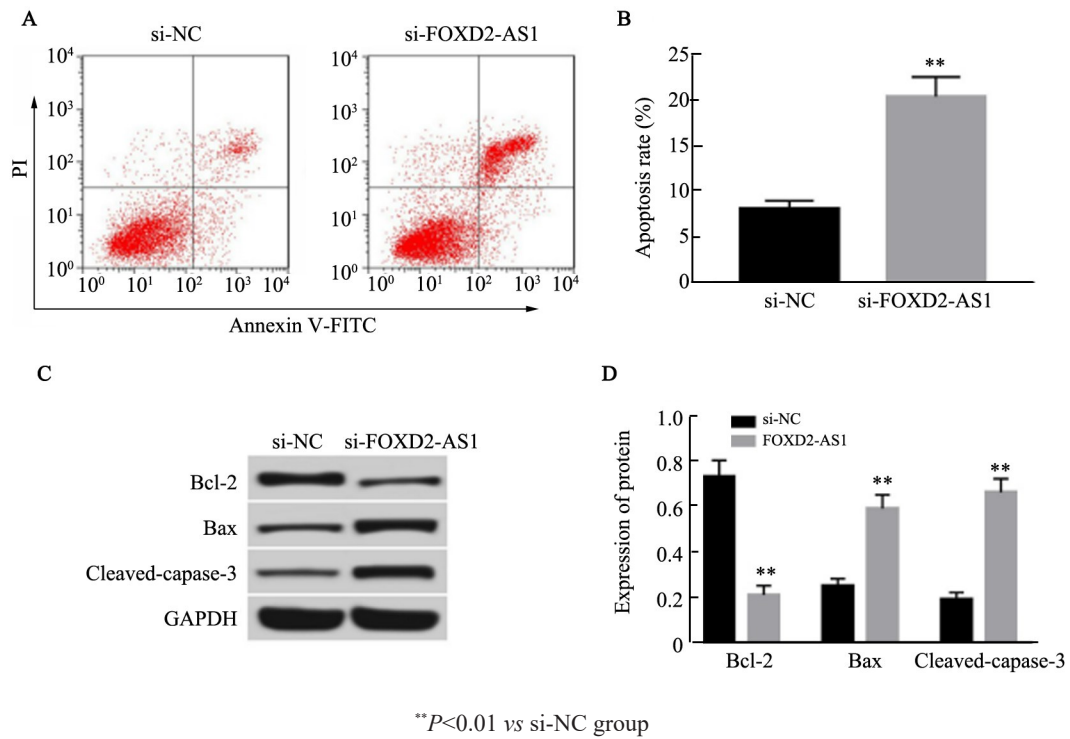


A:The expression of FOXD2-AS1 in HeLa cells was detected by qPCR; B:The proliferation ability of HeLa cells was tested by MTT;

C and D: WB detected the expression of proliferation-related proteins in HeLa cells

图2 抑制 FOXD2-AS1 表达对宫颈癌 HeLa 细胞增殖及相关蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of FOXD2-AS1 knockdown on proliferation and expressions of proliferation-related proteins in cervical carcinoma HeLa cells



A and B: The apoptosis of HeLa cells was detected by flow cytometry;

C and D: The expression of apoptosis-related proteins in HeLa cells by WB

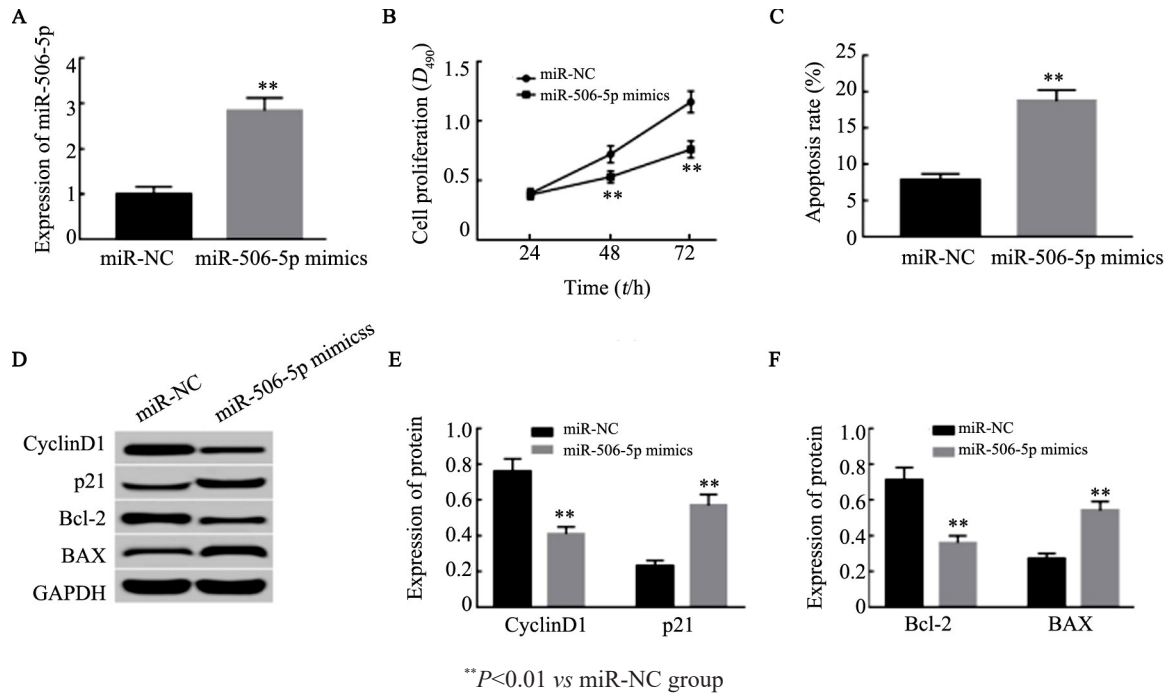
图3 抑制 FOXD2-AS1 表达对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of FOXD2-AS1 knockdown on apoptosis and expressions of apoptosis-related proteins in cervical carcinoma HeLa cells

2.4 过表达 miR-506-5p 抑制 HeLa 细胞增殖而促进其凋亡

与 miR-NC 组比较, miR-506-5p mimics 组宫颈癌细胞中 miR-506-5p 表达水平显著升高 ($t=18.973$, $P<0.01$; 图 4A), 培养 48 和 72 h 时细胞增殖能力显著降低 ($t=3.904, 11.713$, 均 $P<0.01$; 图 4B), 细胞凋亡率

显著升高 ($t=17.779$, $P<0.01$; 图 4C), 细胞中 CyclinD1 蛋白和 Bcl-2 蛋白表达降低 ($t=11.739, 12.410$, 均 $P<0.01$), p21 蛋白和 BAX 蛋白表达升高 ($t=18.973, 14.758$, 均 $P<0.01$; 图 4D、E 和 F)。实验结果表明, 过表达 miR-506-5p 明显抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖而促进其凋亡。



A: The expression of miR-506-5p in HeLa cells was detected by qPCR; B: The proliferation ability of HeLa cells was tested by MTT; C: The apoptosis of HeLa cells was detected by flow cytometry; D-F: WB detected the expression of proliferation and apoptosis-related proteins in HeLa cells

图4 过表达 miR-506-5p 对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响

Fig.4 Effects of miR-506-5p over-expression on proliferation and apoptosis of cervical cancer cells

2.5 FOXD2-AS1 靶向调控 miR-506-5p 的表达

生物信息学软件 TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/) 分析结果 (图 5A) 显示, miR-506-5p 能够与 FOXD2-AS1 的 3' UTR 区互补结合。双荧光素报告基因实验结果 (图 5B) 显示, miR-506-5p 和 Wt-FOXD2-AS1 共表达的宫颈癌细胞中 FOXD2-AS1 活性降低, 而 miR-506-5p 和 Mut-FOXD2-AS1 共表达的宫颈癌细胞中 FOXD2-AS1 活性无明显变化。WB 实验结果 (图 5C) 显示, 与 pcDNA 组比较, pcDNA-FOXD2-AS 组宫颈癌细胞中 miR-506-5p 表达水平降低 ($t=17.240$, $P<0.01$); 与 si-NC 组比较, si-FOXD2-AS 组细胞中 miR-506-5p 表达水平升高 ($t=15.178$, $P<0.01$)。实验结果表明, FOXD2-AS1 靶向负调控 miR-506-5p 的表达。

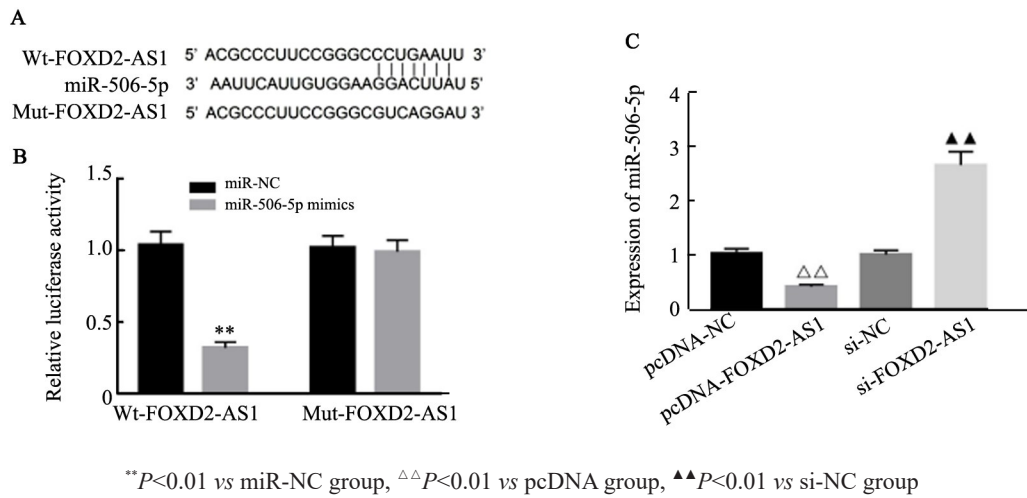
2.6 抑制 miR-506-5p 表达可逆转 FOXD2-AS1 对 HeLa 细胞增殖和凋亡的作用

与 si-FOXD2-AS1 + anti-miR-NC 组比较, si-

FOXD2-AS1+anti-miR-506-5p 组宫颈癌细胞中 miR-506-5p 表达水平降低 ($t=8.578$, $P<0.01$; 图 6A), 培养 48 和 72 h 时细胞增殖能力显著增强 ($t=8.321, 13.430$, 均 $P<0.01$; 图 6B), 细胞凋亡率显著降低 ($t=7.373$, $P<0.01$; 图 6C), 细胞中 CyclinD1 蛋白和 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($t=18.025, 16.483$, 均 $P<0.01$; 图 6D、E 和 F), p21 蛋白和 BAX 蛋白表达水平显著降低 ($t=15.756, 12.999$, 均 $P<0.01$; 图 6D、E 和 F)。结果表明, 抑制 miR-506-5p 表达逆转了抑制 FOXD2-AS1 表达对宫颈癌细胞增殖和凋亡的作用。

3 讨论

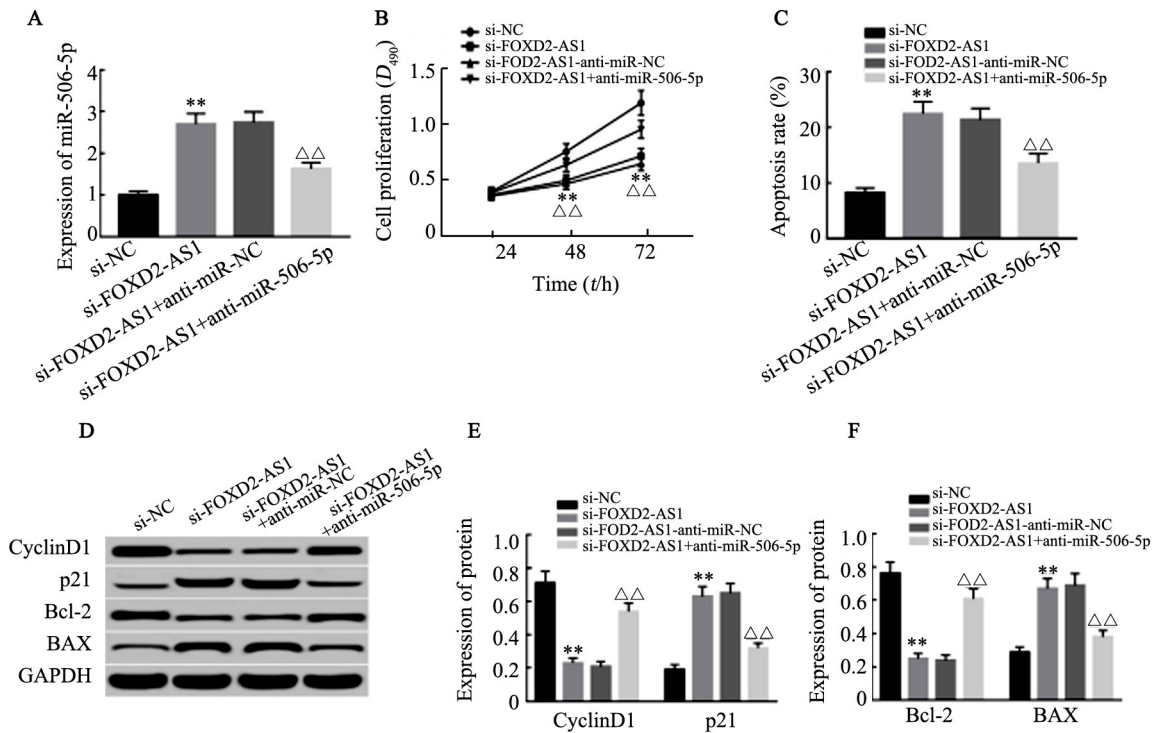
FOXD2-AS1 在肿瘤中的促癌作用已得到了广泛研究。本研究结果显示, FOXD2-AS1 在宫颈癌各细胞株中均表达上调, 抑制 FOXD2-AS1 表达后宫颈癌 HeLa 细胞增殖能力显著降低, 细胞凋亡率增加。CyclinD1 是一种细胞周期蛋白, 调控细胞周期由 G1 期



** $P < 0.01$ vs miR-NC group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs pcDNA group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs si-NC group
A: The analysis results of bioinformatics software; B: The results of double luciferin reporter gene assay;
C: The expression of mir-506-5p in HeLa cells was detected by WB

图5 FOXD2-AS1 靶向调控 miR-506-5p 的表达

Fig.5 FOXD2-AS1 regulated the expression of miR-506-5p



** $P < 0.01$ vs si-NC group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs si-FOXD2-AS1+anti-miR-NC group

A: The expression of FOXD2-AS1 in HeLa cells was detected by qPCR; B: The proliferation ability of HeLa cells was tested by MTT;
C: The apoptosis of HeLa cells was detected by flow cytometry; D-F: WB detected the expression of proliferation and apoptosis-related proteins in HeLa cells

图6 同时抑制 miR-506-5p 和 FOXD2-AS1 表达对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响

Fig.6 Effect of simultaneous inhibition of miR-506-5p and FOXD2-AS1 on the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells

进入S期,其异常失调促进细胞过度增殖是肿瘤发生发展的重要原因^[8]。p21和p27是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子,通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶活性而阻滞细胞进入S期或阻断S期细胞的DNA合成,调控细胞周期^[9-10]。Bcl-2和BAX是Bcl-2家族

成员,其中Bcl-2是抗凋亡蛋白,BAX是促凋亡蛋白,在线粒体参与的凋亡途径中起重要调控作用^[11]。Caspase家族是半胱氨酸依赖性细胞死亡蛋白酶,其成员caspase-3是细胞凋亡执行因子,可直接降解细胞内结构蛋白和功能蛋白,引起细胞凋亡^[12]。本研究结果显

示,抑制 FOXD2-AS1 表达后宫颈癌细胞中 CyclinD1、Bcl-2 蛋白表达水平显著降低,p21、p27、BAX 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达水平显著升高,说明抑制 FOXD2-AS1 后可能通过调控细胞周期蛋白和细胞凋亡蛋白影响宫颈癌细胞的增殖和凋亡。

近年来,miR-506 作为一种潜在的抑癌基因受到越来越多的重视^[13]。据报道^[14],miR-506 在卵巢癌中表达抑制促进卵巢癌细胞侵袭,而过表达 miR-506 的卵巢癌细胞增殖活性明显受到抑制。miR-506 在鼻咽癌细胞中表达下调,其过表达显著抑制鼻咽癌细胞增殖、集落形成和侵袭^[15]。在肝癌研究中也具有相同的结果^[16];提示 miR-506 可能是肿瘤治疗的潜在的新型靶点。本研究结果显示,miR-506-5p 在宫颈癌各细胞株中表达均下调,在宫颈癌细胞中过表达 miR-506-5p 后,细胞的增殖能力显著降低、凋亡率升高,细胞中 CyclinD1 蛋白和 Bcl-2 蛋白表达水平降低、p21 蛋白和 BAX 蛋白表达水平升高,结果说明 miR-506-5p 在宫颈癌中发挥抑癌作用。

双荧光素酶报告基因实验验证在宫颈癌细胞中 FOXD2-AS1 靶向负调控 miR-506-5p 的表达。为进一步证实 FOXD2-AS1 对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响是否与靶向 miR-506-5p 有关,本研究在宫颈癌细胞中同时抑制 FOXD2-AS1 和 miR-506-5p 表达,结果与单独抑制 FOXD2-AS1 的宫颈癌细胞相比,FOXD2-AS1 和 miR-506-5p 共抑制的宫颈癌细胞增殖能力显著升高、细胞凋亡率降低,细胞中 CyclinD1 蛋白和 Bcl-2 蛋白表达升高,p21 蛋白和 BAX 蛋白表达降低。结果说明,抑制 miR-506-5p 后,逆转了 FOXD2-AS1 对宫颈癌细胞增殖的抑制作用和对细胞凋亡的促进作用,推测抑制 FOXD2-AS1 对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响是通过靶向负调控 miR-506-5p 实现的。

综上所述,宫颈癌细胞中 FOXD2-AS1 表达上调、miR-506-5p 表达下调,干扰 FOXD2-AS1 表达可通过靶向负调控 miR-506-5p 的表达,从而抑制宫颈癌细胞增殖并促进细胞凋亡。本研究为 FOXD2-AS1 和 miR-506-5p 在宫颈癌分子靶向治疗中的应用提供了实验基础,但 miR-506-5p 调控宫颈癌细胞增殖和凋亡的作用机制尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 邓镇涛,许明,王燕.长链非编码RNA与恶性肿瘤发生发展关系的研究进展[J].基因组学与应用生物学,2016,35(9):2286-2288. DOI:10.13417/j.gab.035.002286.
- [2] 张清,宋晓婕,侯俐,等.长链非编码RNA FOXD2-AS1对卵巢癌细胞增殖和迁移的影响[J].中国肿瘤临床,2018,45(13):662-666. DOI:10.3969/j.issn.1000-8179.2018.13.393.
- [3] XU T P, WANG Y, MA P, et al. Upregulation of the long noncoding RNA FOXD2-AS1 promotes carcinogenesis by epigenetically silencing EphB3 through EZH2 and LSD1, and predicts poor prognosis in gastric cancer[J/OL]. *Oncogene*, 2018, 37(36): 5020-5036 [2019-04-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29789713/>. DOI:10.1038/s41388-018-0308-y.
- [4] SU F, HE W, CHEN C H, et al. The long non-coding RNA FOXD2-AS1 promotes bladder cancer progression and recurrence through a positive feedback loop with Akt and E2F1[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 233[2019-04-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5833400/>. DOI:10.1038/s41419-018-0275-9.
- [5] 刘洪璐,王熙才.外周血miRNA应用于肿瘤早期诊断的研究进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2018,25(2):109-117. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2018.02.001.
- [6] 朱小晖,张申华.宫颈癌组织中microRNA-506表达及临床病理意义[J].蚌埠医学院学报,2016,41(3):325-328. DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.03.015.
- [7] WEN S Y, LIN Y, YU Y Q, et al. MiR-506 acts as a tumor suppressor by directly targeting the hedgehog pathway transcription factor Gli3 in human cervical cancer[J]. *Oncogene*, 2015, 34(6): 717-725. DOI:10.1038/onc.2014.9.
- [8] 丁玉梅,王新美,马丽丽,等. Cyclin D1 在宫颈癌组织中的表达及临床评价[J].中国妇幼保健,2015,30(6):946-948. DOI:10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2015.06.49.
- [9] MILDE-LANGOSCH K, BAMBERGER A M, METHNER C, et al. Expression of cell cycle-regulatory proteins Rb, p16/MTS1, p27/KIP1, p21/WAF1, cyclin D1 and cyclin E in breast cancer: correlations with expression of activating protein-1 family members[J]. *Int J Cancer*, 2000, 87(4): 468-472.
- [10] GALLASTEGUI E, BIÇERA, ORLANDO S, et al. P27^{Kip1} represses the Pitx2-mediated expression of p21^{Cip1} and regulates DNA replication during cell cycle progression[J]. *Oncogene*, 2017, 36(3): 350-361. DOI: 10.1038/ onc. 2016.200. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27270438/>.
- [11] 孙瑞. CLDN6对宫颈癌细胞凋亡、凋亡相关蛋白及Akt信号通路活性的影响[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2017,26(5):490-496. DOI:10.16705/j.cnki.1004-1850.2017.05.011.
- [12] 向丹,罗琴. Galectin-3 基因调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对肺癌细胞凋亡的影响[J].中国老年学杂志,2018,38(2):289-291.
- [13] 赵嘉盛,陈敏强,田猛,等.常见恶性肿瘤发生发展过程中miR-506作用机制研究进展[J].社区医学杂志,2018,16(5):83-86.
- [14] LIU G Y, SUN Y, JI P, et al. MiR-506 suppresses proliferation and induces senescence by directly targeting the CDK4/6-FOXM1 axis in ovarian cancer[J/OL]. *J Pathol*, 2014, 233(3): 308-318[2019-04-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4144705/>. DOI:10.1002/path.4348.
- [15] ZHANG Z C, MA J, LUAN G, et al. MiR-506 suppresses tumor proliferation and invasion by targeting FOXP1 in nasopharyngeal carcinoma[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122851[2019-04-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4391879/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0122851.
- [16] WANG Y, CHEN F Q, ZHAO M, et al. MiR-107 suppresses proliferation of hepatoma cells through targeting HMGA2 mRNA 3'UTR [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(3): 455-460. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.070.

[收稿日期] 2019-04-16

[修回日期] 2019-08-19

[本文编辑] 党瑞山