

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.10.004

· 基础研究 ·

过表达 miR-129-5p 通过靶向 MAPK1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞恶性生物行为

瞿小玲¹, 曾仪², 姚利¹, 蔡政³ (1. 南阳市中心医院 产二科, 河南 南阳 473000; 2. 郑州大学 基础医学部, 河南 郑州 450000; 3. 云南省中医医院 肿瘤科, 云南 昆明 650021)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-129-5p 对宫颈癌 HeLa 细胞侵袭、迁移和 EMT 的作用及其机制。**方法:** 选取宫颈癌 HeLa 细胞, 利用生物信息学预测软件筛选 miR-129-5p 的靶基因, 双荧光素酶报告基因验证 miR-129-5p 和 MAPK1 的靶向关系。将 miR-129-5p mimic、miR-129-5p inhibitor 和 pcDNA-MAPK1 单独或联合转染到 HeLa 细胞, 用 qPCR 检测 HeLa 细胞中 miR-129-5p 和 MAPK1 的表达水平, 用 Transwell、划痕愈合实验分别检测 HeLa 细胞的侵袭、迁移能力, WB 检测细胞中 E-cadherin、N-cadherin、MAPK1、STAT3 和 Bcl-xL 的表达。构建裸鼠 HeLa 细胞皮下移植瘤模型, 观察 miR-129-5p 过表达对移植瘤生长的影响, WB 检测移植瘤组织中 EMT 及 MAPK1 通路相关蛋白的表达。**结果:** miR-129-5p 与 MAPK1 在 3'UTR 区存在结合位点, 过表达 miR-129-5p 靶向抑制 MAPK1 ($P<0.01$)。与对照组相比, miR-129-5p mimic 组侵袭细胞数目减少 ($P<0.01$), 划痕愈合率降低 (均 $P<0.01$); 细胞中 E-cadherin 表达上调而 N-cadherin、MAPK1、STAT3 和 Bcl-xL 表达下调 (均 $P<0.01$); 共转染 MAPK1 可逆转上述现象。成功建立裸鼠 HeLa 细胞移植瘤模型, 与对照组相比, miR-128-3p mimic 组肿瘤质量减轻 ($P<0.01$); 瘤组织中 E-cadherin 表达水平上调而 N-cadherin、MAPK1、STAT3 和 Bcl-xL 的表达下调 (均 $P<0.01$)。**结论:** 过表达 miR-129-5p 通过靶向 MAPK1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的侵袭、迁移和 EMT。

[关键词] 宫颈癌; HeLa 细胞; miR-129-5p; MAPK1; 侵袭; 迁移; 上皮间质转化

[中图分类号] R737.33; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)10-1075-08

Over-expression of miR-129-5p inhibits malignant biological behaviors of cervical cancer HeLa cells by targeting MAPK1

QU Xiaoling¹, ZENG Yi², YAO Li¹, CAI Zheng³ (1. Second Department of Obstetrics, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, Henan, China; 2. Department of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan, China; 3. Department of Oncology, Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, Yunnan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and mechanisms of miR-129-5p on invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cervical cancer HeLa cells. **Methods:** Cervical cancer HeLa cells were selected. The target gene of miR-129-5p was screened by bioinformatics prediction software, and the targeting relationship between miR-129-5p and MAPK1 was verified by dual luciferase reporter gene assay. HeLa cells were transfected with miR-129-5p mimic, miR-129-5p inhibitor and pcDNA-MAPK1 alone or in combination. The expressions of miR-129-5p and MAPK1 in HeLa cells were detected by qPCR; the invasion and migration ability of HeLa cells were detected by Transwell and scratch-healing experiments, respectively; and the expressions of E-cadherin, N-cadherin, MAPK1, STAT3 and Bcl-xL were detected by WB. The subcutaneous xenograft model of HeLa cells in nude mice was constructed to observe the effect of miR-129-5p over-expression on the growth of transplanted tumors. The expressions of EMT and MAPK1 pathway-related proteins in transplanted tumor tissues were detected by WB. **Results:** miR-129-5p could bind with the 3'UTR region of MAPK1, and over-expression of miR-129-5p targetedly inhibited the expression of MAPK1 ($P<0.01$). Compared with the control group, the number of invasive cells in the miR-129-5p mimic group decreased ($P<0.01$), the scratch healing rate decreased (all $P<0.01$); The expression of E-cadherin was up-regulated, and the expressions of N-cadherin, MAPK1, STAT3 and Bcl-xL were down-regulated (all $P<0.01$), while co-transfection of MAPK1 reversed the above phenomenon. The nude mice HeLa cell xenograft model was successfully established. Compared with the control group, the tumor mass of the miR-128-3p mimic group was reduced; the expression of E-cadherin

[基金项目] 河南省科技发展基金资助项目 (No.132102310388)。Project supported by the Science and Technology Development Foundation of Henan Province (No.132102310388)

[作者简介] 瞿小玲 (1986-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤的研究, E-mail: ino1cm00c6si@sina.com

[通信作者] 蔡政 (CAI Zheng, corresponding author), 博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤的抗血管生成和免疫治疗研究, E-mail: caizheng999@126.com

was up-regulated in tumor tissues, while the expressions of N-cadherin, MAPK1, STAT3 and Bcl-xL were down-regulated (all $P < 0.01$).

Conclusion: Over-expression of miR-129-5p inhibits invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer HeLa cells by targeting MAPK1.

[Key words] cervical cancer; HeLa cell; miR-129-5p; MAPK1; invasion; migration; epithelial-mesenchymal transition

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(10): 1075-1082. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.10.004]

宫颈癌是临床上常见的妇科恶性肿瘤之一,也是全球女性第4位常见的恶性肿瘤,其发病率呈逐年上升趋势^[1]。宫颈癌通常会引发输尿管阻塞等局部疾病致使患者极度痛苦,且多数患者由于社会和家庭压力经常会出现抑郁,严重者轻生^[2]。目前宫颈癌筛查诊断手段已经较为完善,宫颈癌的治疗方式有手术、化疗、放疗等,但对转移、复发性患者的治疗还无法达到令人满意的疗效,因此寻找合理有效的治疗手段是亟待解决的问题^[3]。微小RNA (microRNA, miRNA) 在肿瘤细胞侵袭、迁移和EMT等过程中起重要作用,从而参与肿瘤的发生与发展^[4]。miR-129-5p与乳腺癌、胃癌和前列腺癌等多种肿瘤的发生和发展密切相关^[5-7],外源性miR-129-5p能够抑制宫颈癌细胞的增殖、促进细胞凋亡并阻断HeLa细胞的细胞周期进展^[8],但miR-129-5p对宫颈癌侵袭、迁移和EMT影响的机制尚不清楚。本课题通过体内外实验,探讨过表达miR-129-5p对宫颈癌HeLa细胞侵袭、迁移和EMT的作用及其机制,旨在为宫颈癌的临床治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系、实验动物及主要试剂

人宫颈癌HeLa细胞和正常宫颈上皮H8细胞购自中国科学院细胞库。32只体质量为 (20 ± 2) g的裸鼠购自四川夏派森医药科技有限公司[实验动物合格证号:SYXK(川)2017-203],在25℃,12 h光照/12 h黑暗循环的饲养室,自由获取水和食物,在实验前1周开始适应性喂养。

RPMI 1640培养液、胎牛血清和胰酶均购自Gibco公司,细胞转染试剂盒和逆转录试剂盒购自美国Thermo Fisher公司,Dual-Luciferase® Report试剂盒购自Promega公司,RIPA裂解液、TRIzol试剂和BCA试剂盒购自碧云天生物科技公司,E-cadherin、N-cadherin、Bcl-xL、p-STAT3、STAT3、MAPK1兔来源单克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗购自美国Sigma公司,mimic-NC、miR-219 mimic、miR-219 inhibitor、pcDNA-MAPK1质粒和引物购自上海生工公司,Transwell小室购自美国Corning公司。

1.2 细胞培养、转染及分组

HeLa细胞于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液在37℃、5%CO₂的恒温细胞培养箱中培养,细胞汇

合度达80%以上时进行传代培养。根据转染试剂盒说明书,用Lipofectamine™ 2000将miR-129-5p mimic、miR-129-5p inhibitor和pc-MAPK1转染进HeLa细胞,转染6 h后将转染试剂更换为正常培养液继续培养。依据转染质粒的不同,实验分为:对照组(Ctrl组)、mimic-NC组、miR-219 mimic组、miR-219 inhibitor组、MAPK1组、mimic+pcMAPK1组。

1.3 qPCR检测HeLa细胞中miR-129-5p和MAPK1的表达水平

用TRIzol试剂提取各组细胞总RNA,进行定量分析并调平后,用逆转录试剂盒合成cDNA,PCR仪进行扩增后,根据qPCR试剂盒对cDNA进行定量分析。引物序列:miR-129-5p F为5'-CGGGGGTTTTTTGCGGTCTGGGCT-3',R为5'-CGGCGGTCGTGAAGCGTTCCAT3'; MAPK1, F为5'-AAGTTTCGACGTGGGG-3',R为5'-TCCTTCGGCAAGTCATC-3'。反应条件:95℃预变性30 s,95℃变性10 s,56℃退火30 s,72℃延伸10 s,共30个循环。通过计算机系统自动分析各样本Ct值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算目的RNA的相对表达量。

1.4 双荧光素酶基因报告实验验证MAP1K与miR-128-3p的靶向关系

利用生物信息学基因预测软件TargetScan预测miR-128-3p的靶基因。PCR扩增结合片段并将该片段插入荧光素酶载体中,构建野生型(Wt)及突变型(Mut)MAP1K 3'UTR的报告基因质粒,将其与miR-129-5p mimic和miR-129-5p NC共转染宫颈癌HeLa细胞,用荧光素酶报告基因检测试剂盒,以双荧光素酶测定系统检测细胞转染后表达的荧光素酶活性。以海肾荧光素酶的荧光值作为内参,验证MAP1K与miR-129-5p的靶向关系。

1.5 Transwell实验检测HeLa细胞的侵袭能力

在预铺Matrigel基质胶的Transwell上室中加入细胞密度为 2.5×10^5 个/ml的HeLa细胞悬液和不含血清的培养基,在下室中加入2 ml含血清的培养基,培养48 h后,取出Transwell小室,用1%结晶紫染色,并在显微镜下($\times 400$)观察、计数穿膜细胞数。

1.6 划痕愈合实验检测HeLa细胞的迁移能力

将培养24 h的各组HeLa细胞用胰蛋白酶消化,并将细胞平铺在6孔板上(1×10^5 细胞/孔),设3个平行孔。使用200 μ l无菌枪头轻划孔板,每孔划4~5

次,尽量保证所划线处于平行状态,置于 37℃ 恒温细胞培育箱,在 24 h 后分别用适量 PBS 冲洗孔板,显微镜下观察细胞的迁移距离。

1.7 WB 检测 HeLa 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、Bcl-xL、p-STAT3/STAT3、MAPK1 蛋白的表达

用 RIPA 裂解液提取细胞中总蛋白,并用 BCA 试剂盒对蛋白质进行定量分析并调平。提取总蛋白降解后进行 SDS-PAGE、转膜,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,后加入兔来源单克隆一抗(E-cadherin 1:1 000, N-cadherin 1:1 000, Bcl-xL 1:2 000, p-STAT3 1:500, STAT3 1:1 000, MAPK1 1:500),4℃ 孵育过夜。次日弃去一抗,加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:5 000),室温孵育 1 h 后,滴加 ECL 化学发光显色液,于暗室进行曝光显影,分析蛋白条带的灰度值,以 GAPDH 作为内参进行比较。

1.8 裸鼠皮下 HeLa 细胞移植瘤模型的建立及观察

将裸鼠随机分为对照组和 miR-129-5p mimic 组,16 只/组,雌雄各半。在各组裸鼠后肢腹侧皮下分别注射 0.2 ml 密度为 1×10^7 个/ml HeLa 细胞和转染 miR-129-5p mimic 的 HeLa 细胞悬液,在 SPF 条件下正常饮食饲养,观察裸鼠皮下成瘤情况。30 d 后,颈椎脱位法处死裸鼠,完整取出皮下移植瘤,电子天平称质量。用 WB 检测移植瘤组织中 MAPK1、E-cadherin、N-cadherin、STAT3/p-STAT3 和 Bcl-xL 的表达水平。

1.9 统计学处理

1.3~1.8 实验均重复 3 次。用 SPSS2.1.0 统计软件对实验数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较均采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

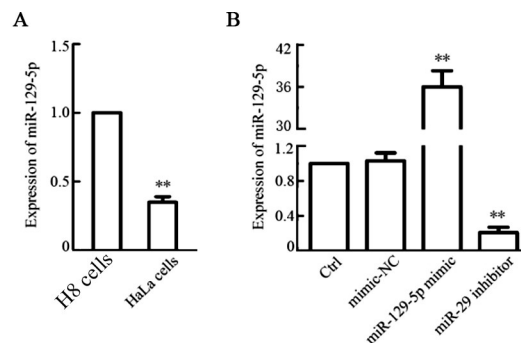
2.1 外源物转染对 HeLa 细胞中 miR-129-5p 表达的影响

qPCR 检测结果(图 1)显示,(1)未转染 HeLa 细胞中 miR-129-5p 表达水平明显低于正常宫颈上皮 H8 细胞($P < 0.01$,图 1A);(2)与对照组比较,mimic-NC 组细胞中 miR-129-5p 表达水平无明显变化($P > 0.05$),说明空载质粒对细胞 miR-129-5p 表达无影响;(3)与 mimic-NC 组比较,miR-129-5p mimic 组细胞中 miR-129-5p 表达水平显著上调($P < 0.01$),miR-129-5p inhibitor 组细胞中 miR-129-5p 表达水平显著下调($P < 0.01$,图 1B)。结果表明,成功转染 miR-129-5p mimic、miR-129-5p inhibitor 等。

2.2 miR-129-5p 靶向结合于 MAPK1 的 3' UTR 区

通过基因预测软件 miRanda、TargetScan、TarBase 等筛选出 MAPK1 作为 miR-129-5p 的靶基因,miR-129-5p 与 MAPK1 在 3' UTR 区存在结合位点(图

2A)。



** $P < 0.01$ vs H8 cells or Ctrl or mimic-NC group

A: miR-129-5p expression in HeLa cells and cervical cells;

B: miR-129-5p expression in transfected HeLa cells

图1 外源物转染对 HeLa 细胞中 miR-129-5p 表达的影响

Fig.1 Effect of exogenous nucleic acid transfection on the expression of miR-129-5p in HeLa cells

qPCR 检测结果(图 2B)表明,与对照组相比,mimic-NC 组细胞中 miR-129-5p 表达水平无明显变化($P > 0.05$),miR-129-5p mimic 组 MAPK1 表达水平显著下调($P < 0.01$),miR-129-5p inhibitor 组 MAPK1 表达量显著上调($P < 0.01$),pcMAPK1 组 MAPK1 表达量显著上调($P < 0.01$),说明空载质粒对细胞 MAPK1 表达无影响,miR-129-5p mimic 对 MAPK1 具有抑制作用,miR-129-5p inhibitor 和 pcDNA-MAPK1 能使 MAPK1 过表达;mimic+pcMAPK1 组 MAPK1 的表达水平与对照组和 mimic-NC 组比无明显变化(均 $P > 0.05$),较 miR-129-5p mimic 组显著上调($P < 0.01$),较 miR-129-5p inhibitor 组和 pcMAPK1 组显著下调(均 $P < 0.01$)。实验结果说明,过表达 miR-129-5p 能抑制 MAPK1 表达。

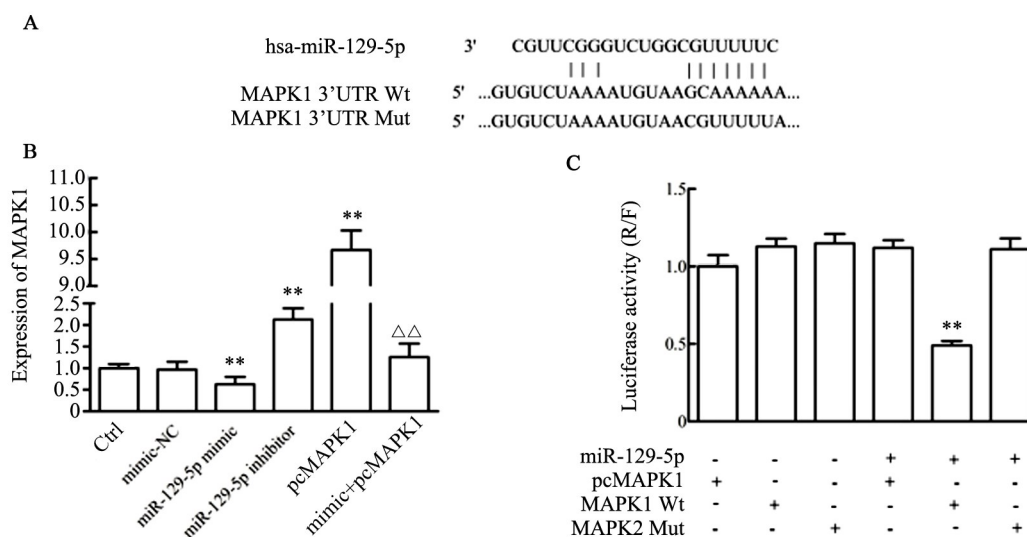
双荧光素酶报告基因实验结果(图 2C)表明,miR-129-5p 对野生型 MAPK1 表达有明显下调作用,对突变型没有明显作用($P < 0.01$),提示 miR-129-5p 直接靶向作用于 MAPK1。

2.3 miR-129-5p 过表达通过靶向 MAPK1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的侵袭

Transwell 实验结果(图 3)显示,与对照组比较,mimic-NC 组侵袭细胞数目无明显变化($P > 0.05$),miR-129-5p mimic 组侵袭细胞数目显著减少($P < 0.01$),miR-129-5p inhibitor 组侵袭细胞数目显著增多($P < 0.01$),pcMAPK1 组侵袭细胞数目显著增多($P < 0.01$)。结果表明,空载质粒对 HeLa 细胞侵袭能力无影响,miR-129-5p mimic 对 HeLa 细胞侵袭能力具有抑制作用,miR-129-5p inhibitor 和 pcMAPK1 促进 HeLa 细胞的侵袭能力。mimic+pcMAPK1 组侵袭细

胞数目与对照组和 mimic-NC 组比无明显变化 ($P>0.05$), 比 miR-129-5p mimic 组显著增多 ($P<0.01$), 比 miR-129-5p inhibitor 组和 pcMAPK1 组显著减少 (均

$P<0.01$)。结果表明, miR-129-5p 过表达通过靶向 MAPK1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞侵袭。

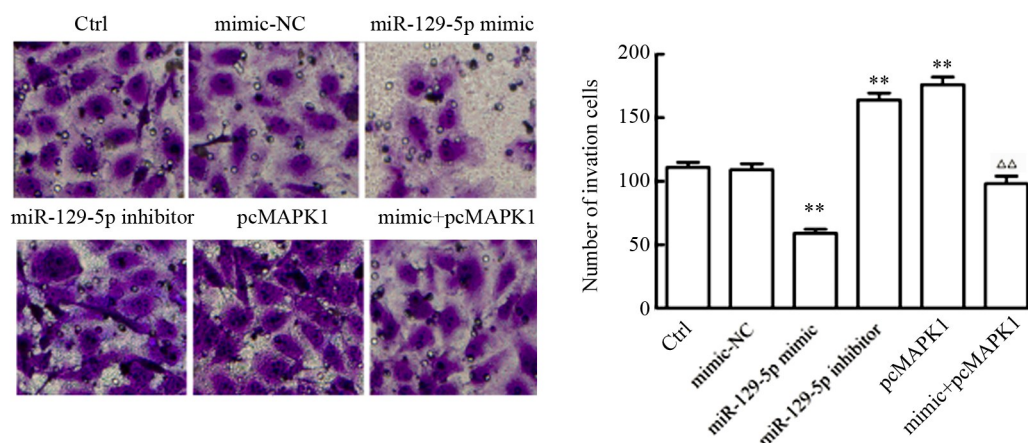


** $P<0.01$ vs Ctrl or mimic-NC group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs Single transfection group

A: The target genes of miR-128-3p were screened by the gene prediction software; B: The expression of MAPK1 was detected by qPCR; C: Targeting relationship was detected by luciferase activity

图2 miR-129-5p 靶向作用于 MAPK1

Fig.2 miR-129-5p targeted MAPK1



** $P<0.01$ vs Ctrl or mimic-NC group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs Single transfection group

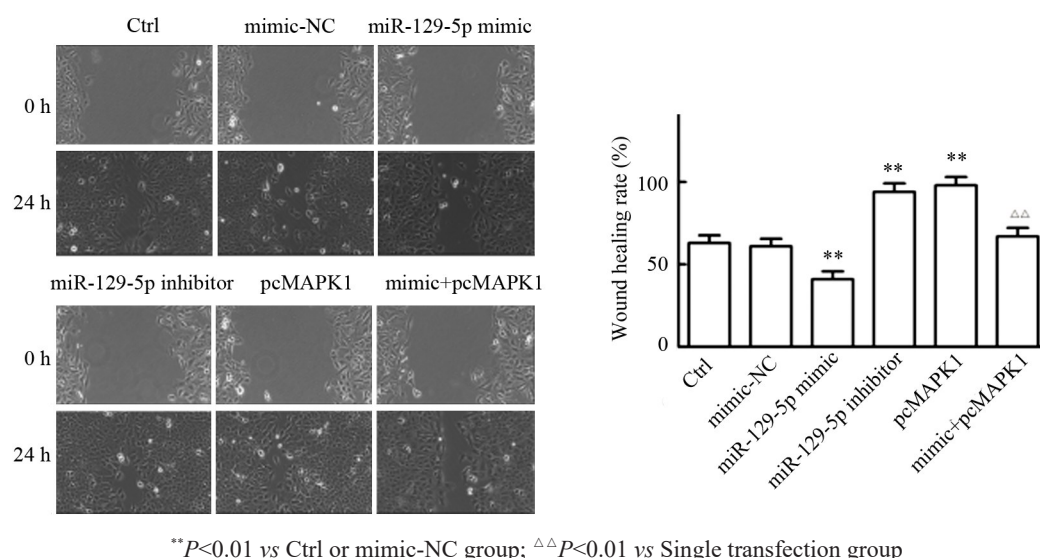
图3 miR-129-5p 过表达影响 HeLa 细胞侵袭能力(结晶紫染色, $\times 400$)

Fig.3 Effects of miR-129-5p over-expression on the invasion ability of HeLa cells (crystal violet staining, $\times 400$)

2.4 miR-129-5p 过表达通过靶向 MAPK1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞迁移

划痕愈合实验结果(图4)表明,与对照组相比, mimic-NC 组划痕宽度无明显变化 ($P>0.05$), miR-129-5p mimic 组划痕显著增宽、愈合率降低 ($P<0.01$), miR-129-5p inhibitor 组划痕变窄、愈合率显著升高 ($P<0.01$), pcMAPK1 组划痕变窄、愈合率升高 ($P<0.01$), 说明空载质粒对 HeLa 细胞迁移速度无影响,

miR-129-5p mimic 对 HeLa 细胞迁移速度具有抑制作用, miR-129-5p inhibitor 和 pcDNA-MAPK1 促进 HeLa 细胞迁移; mimic+MAPK1 组划痕愈合率, 与对照组和 mimic-NC 组比无明显变化 (均 $P>0.05$), 较 miR-129-5p mimic 组显著升高 ($P<0.01$), 较 miR-129-5p inhibitor 组和 pcMAPK1 组显著降低 (均 $P<0.01$)。结果表明, miR-129-5p 过表达靶向通过 MAPK1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的迁移。



** $P < 0.01$ vs Ctrl or mimic-NC group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Single transfection group

图4 miR-129-5p 过表达抑制 HeLa 细胞迁移能力的影响

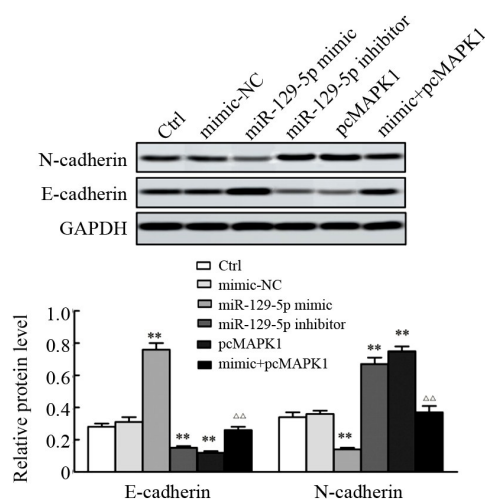
Fig.4 Effects of miR-129-5p over-expression on the migration ability of HeLa cells

2.5 miR-129-5p 过表达通过靶向 MAPK1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的 EMT 进程

WB 检测结果(图5)显示,与对照组比较,mimic-NC 组 E-cadherin 和 N-cadherin 的表达无明显变化(均 $P > 0.05$),miR-129-5p mimic 组 E-cadherin 表达显著上调、N-cadherin 表达显著下调(均 $P < 0.01$),miR-129-5p inhibitor 组 E-cadherin 表达显著下调、N-cadherin 表达显著上调(均 $P < 0.01$),pcMAPK1 组 E-cadherin 表达显著下调、N-cadherin 表达显著上调(均 $P < 0.01$);说明空载质粒对 HeLa 细胞 EMT 无影响,miR-129-5p mimic 对 HeLa 细胞 EMT 具有抑制作用,miR-129-5p inhibitor 和 pcMAPK1 促进 HeLa 细胞 EMT。mimic+pcMAPK1 组 E-cadherin 表达,与对照组和 mimic-NC 组比无明显变化(均 $P > 0.05$),较 miR-129-5p mimic 组显著下调(均 $P < 0.01$),较 miR-129-5p inhibitor 组和 pcMAPK1 组显著上调(均 $P < 0.01$);mimic+pcMAPK1 组 N-cadherin 表达,与对照组和 mimic-NC 组比较无明显变化(均 $P > 0.05$),较 miR-129-5p mimic 组显著上调(均 $P < 0.01$),较 miR-129-5p inhibitor 组和 pcMAPK1 组显著下调(均 $P < 0.01$),说明 miR-129-5p 过表达靶向 pcMAPK1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞 EMT 进程。

2.6 miR-129-5p 过表达通过靶向 MAPK1 抑制 MAPK1 通路激活

WB 检测结果(图6)显示,与对照组比较,mimic-NC 组 MAPK1、STAT3 和 Bcl-xL 的表达无明显变化(均 $P > 0.05$),miR-129-5p mimic 组 MAPK1、STAT3 和 Bcl-xL 的表达显著下调(均 $P < 0.01$),miR-129-5p inhibitor 组 MAPK1、STAT3 和 Bcl-xL 的表达显著下调



** $P < 0.01$ vs Ctrl or mimic-NC group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Single transfection group

图5 miR-129-5p 过表达抑制 HeLa 细胞 E-cadherin 和 N-cadherin 表达的影响

Fig.5 Effects of miR-129-5p over-expression on the expressions of E-cadherin and N-cadherin in HeLa cells

(均 $P < 0.01$),pcMAPK1 组 MAPK1、STAT3 和 Bcl-xL 的表达显著下调(均 $P < 0.01$),说明空载质粒对 HeLa 细胞 MAPK1 通路无影响,miR-129-5p mimic 抑制 HeLa 细胞 MAPK1 通路激活,miR-129-5p inhibitor 和 pcDNA-MAPK1 诱导 HeLa 细胞 pcMAPK1 通路激活;miR-129-5p mimic 组 MAPK1、STAT3 和 Bcl-xL 的表达,与对照组和 mimic-NC 组比无明显变化(均 $P > 0.05$),较 miR-129-5p mimic 组显著上调(均 $P < 0.01$),较 miR-129-5p inhibitor 组和 pcMAPK1 组显著下调

(均 $P < 0.01$), 说明 miR-129-5p 过表达通过靶向 MAPK1 抑制 MAPK1 通路激活。

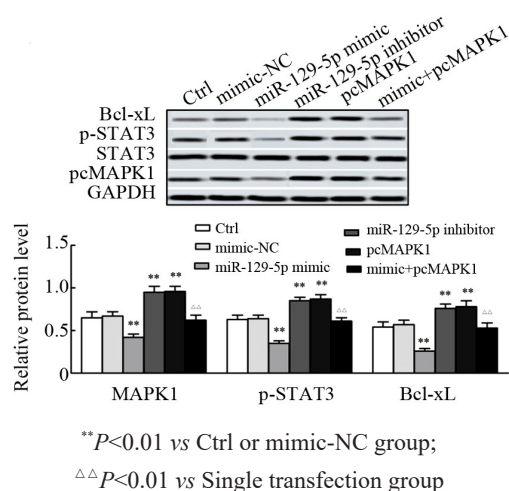


图6 miR-129-5p过表达对HeLa细胞EMT相关蛋白表达的影响

Fig.6 Effects of miR-129-5p over-expression on the expressions of EMT related proteins in HeLa cells

2.7 miR-129-5p 过表达抑制裸鼠 HeLa 细胞移植瘤生长

成功建立裸鼠 HeLa 细胞皮下移植瘤模型, 30 d

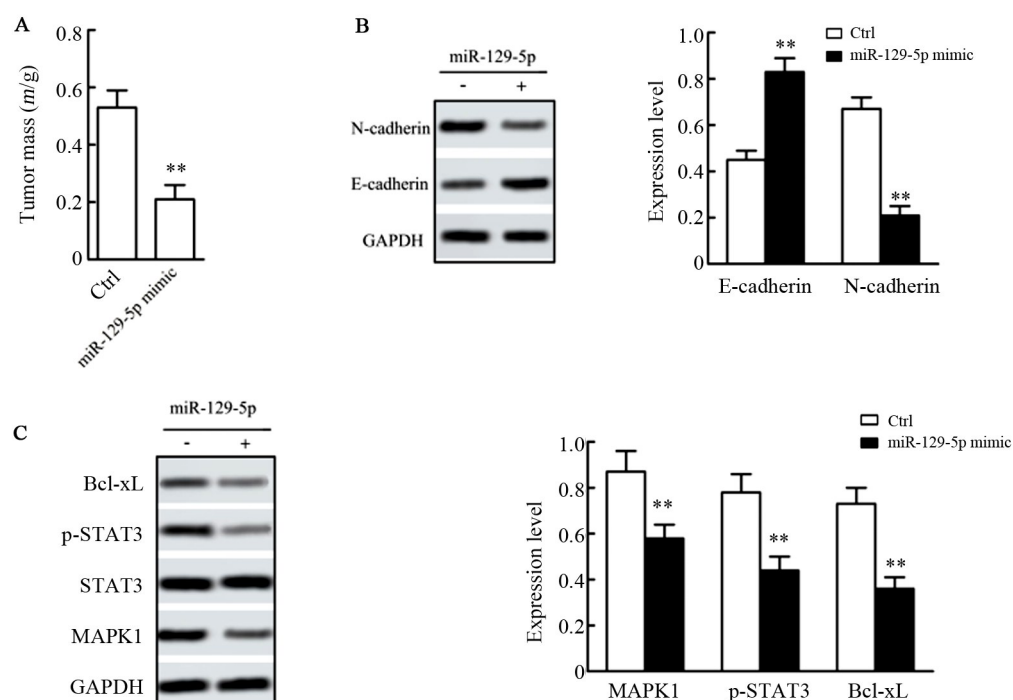
后处死动物, 称移植瘤的质量发现, miR-129-5p mimic 组动物移植瘤的质量显著低于对照组 ($P < 0.01$; 图 7A)。结果表明, miR-129-5p 过表达可以抑制宫颈癌 HeLa 细胞移植瘤体内生长。

WB 检测结果 (图 7B) 显示, 与对照组比较, miR-129-5p mimic 组 E-cadherin 表达水平显著上调、N-cadherin 表达显著下调 (均 $P < 0.01$)。结果表明, 在裸鼠体内 miR-129-5p mimic 明显抑制裸鼠移植瘤 HeLa 细胞 EMT 进程。

WB 检测结果 (图 7C) 显示, 与对照组比较, miR-129-5p mimic 组 MAPK1、STAT3 和 Bcl-xL 表达显著下调 (均 $P < 0.01$)。结果表明, 在裸鼠体内 miR-129-5p mimic 对 HeLa 细胞 MAPK1 通路激活具有抑制作用。

3 讨论

宫颈癌死亡病例中约 85% 发生在发达国家或发展中国家, 在中国宫颈癌已成为女性第二大高发恶性肿瘤, 且每年新发病例 13.15 万, 占全球病例的 28% 以上, 同时每天大约 5 万左右的患者死于该病^[1,9], 因此有效地治疗宫颈癌是亟待解决的问题。



A: Tumor mass statistics; B: The expression levels of E-cadherin and N-cadherin were detected by WB;

C: The expression of MAPK1, STAT3 and Bcl-xL by WB

图7 miR-129-5p过表达对裸鼠 HeLa 细胞移植瘤的影响

Fig.7 Effect of miR-129-5p over-expression on HeLa cell transplanted tumor in nude mice

局部侵袭是限制临床手术有效治疗宫颈癌的重要原因之一,因此降低宫颈癌细胞的侵袭能力可以增强宫颈癌治疗效果,如 miR-454-3p 过表达靶向 c-met 抑制宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭,其可能是一种潜在的宫颈癌治疗手段^[10]。研究^[11]发现,miR-129-5p 过表达可抑制胃癌细胞的侵袭和增殖,其过表达可抑制胃癌细胞的迁移和侵袭^[5]。因此,miR-129-5p 过表达有望抑制宫颈癌细胞的侵袭。本研究结果发现,miR-129-5p 过表达靶向 MAPK1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞侵袭。

远处转移是限制临床外科手术有效治疗宫颈癌的重要原因之一,因此降低宫颈癌细胞的迁移能力可以提高宫颈癌的治疗效果,如 miR-206 通过靶向 BAG3 抑制人宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭,其可能是一种潜在的宫颈癌治疗靶点^[12]。miR-129-5p 过表达可抑制甲状腺髓样癌细胞迁移能力^[13]及软骨肉瘤细胞的迁移^[14]。因此,miR-129-5p 过表达有望抑制宫颈癌细胞的迁移。本研究通过划痕愈合实验发现,miR-129-5p 过表达靶向 MAPK1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的迁移能力。

宫颈癌的侵袭、迁移过程中存在着 EMT 现象,而宫颈癌细胞在发生 EMT 后,细胞表型发生变化,其侵袭和迁移能力显著增强^[15]。miR-25-3p 过表达抑制宫颈癌的生长和 EMT,上调 miR-25-3p 可能是一种治疗耐化疗宫颈癌的新方法^[16],因此有效抑制宫颈癌细胞 EMT 是有效治疗宫颈癌的关键环节之一。miR-129-5p 过表达,可增强肺癌细胞 E-cadherin 表达^[17],显著上调乳腺癌 MCF-7 细胞 E-cadherin 表达,抑制 N-cadherin 表达^[18]。因此,miR-129-5p 过表达有望抑制宫颈癌细胞 EMT。本研究结果发现,过表达 miR-129-5p 靶向 MAPK1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞 EMT 进程。

MAPK1 通路细胞的增殖、凋亡及细胞间功能的同步化过程有着密切联系。已有研究^[19]表明,MAPK1 在宫颈癌组织中高表达,干扰 MAPK1 的表达可以显著抑制宫颈癌 HeLa 细胞的侵袭与迁移,miR-329-3p 靶向 MAPK1 抑制宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭^[20]。因此,MAPK1 通路在宫颈癌中具有重要作用。本研究发现,miR-129-5p 过表达通过靶向 MAPK1 抑制 MAPK1 通路激活。

体外实验发现,过表达 miR-129-5p 通过抑制 MAPK1 表达进而抑制宫颈癌 HeLa 细胞的侵袭及迁移能力、EMT 及 MAPK1 通路激活。相比单一的实验外部环境,机体内环境复杂多变,为了更好地了解 miR-129-5p 对宫颈癌的作用,本研究通过裸鼠体内实验研究发现,过表达 miR-129-5p 抑制裸鼠体内宫颈癌移植瘤的生长,并可在裸鼠体内抑制宫颈癌细

胞的 EMT 及 MAPK1 通路激活。

综上所述,miR-129-5p 过表达靶向抑制 MAPK1,且通过靶向 MAPK1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞的侵袭、迁移、EMT 和 MAPK1 通路的激活。提示 miR-129-5p 在宫颈癌的治疗中具有重要意义,此为临床靶向治疗宫颈癌提供了一定的实验基础。

[参考文献]

- [1] 贾静,方健飞,任娟,等. 宫颈癌 HeLa 细胞内 SKP2 结合蛋白的筛选和功能预测[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(3):258-262. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.03.008.
- [2] SMALL W Jr, BACON M A, BAJAJ A, et al. Cervical cancer: a global health crisis[J]. Cancer, 2017, 123(13): 2404-2412. DOI: 10.1002/cncr.30667.
- [3] 何伟明,吴庆金,何玉清. 女性肿瘤标志物联合检测的研究现状及其应用前景[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(2):192-197. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.02.015.
- [4] SHUKLA G C, SINGH J, BARIK S. MicroRNAs: processing, maturation, target recognition and regulatory functions[J/OL]. Mol Cell Pharmacol, 2011, 3(3): 83-92[2019-05-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3315687/>.
- [5] JIANG Z, WANG H, LI Y, et al. MiR-129-5p is down-regulated and involved in migration and invasion of gastric cancer cells by targeting interleukin-8[J]. Neoplasma, 2016, 63(5): 673-680. DOI: 10.4149/neo_2016_503.
- [6] ZENG H J, WANG L L, WANG J J, et al. MicroRNA-129-5p suppresses Adriamycin resistance in breast cancer by targeting SOX2 [J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 651: 52-60. DOI: 10.1016/j.abb.2018.05.018.
- [7] XU S, GE J P, ZHANG Z Y, et al. MiR-129 inhibits cell proliferation and metastasis by targeting ETS1 via PI3K/AKT/mTOR pathway in prostate cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 634-641. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.037.
- [8] ZHANG J R, LI S D, YAN Q, et al. Interferon- β induced microRNA-129-5p down-regulates HPV-18 E6 and E7 viral gene expression by targeting SP1 in cervical cancer cells[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(12): e81366[2019-05-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3864787/>. DOI:10.1371/journal.pone.0081366.
- [9] 顾秀瑛. 2014 年中国女性子宫颈癌发病与死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(4): 241-246. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2018.04.001.
- [10] GUO Y, TAO M, JIANG M. MicroRNA-454-3p inhibits cervical cancer cell invasion and migration by targeting c-Met[J/OL]. Exp Ther Med, 2018, 15(3): 2301-2306[2019-05-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5854935/>. DOI: 10.3892/etm.2018.5714.
- [11] WANG Q, YU J H. MiR-129-5p suppresses gastric cancer cell invasion and proliferation by inhibiting COL1A1[J]. Biochem Cell Biol, 2018, 96(1): 19-25. DOI:10.1139/bcb-2016-0254.
- [12] WANG Y Y, TIAN Y J. MiR-206 inhibits cell proliferation, migration, and invasion by targeting BAG3 in human cervical cancer[J]. Oncol Res, 2018, 26(6): 923-931. DOI:10.3727/096504017X15143731031009.

- [13] DUAN L J, HAO X F, LIU Z Y, et al. MiR-129-5p is down-regulated and involved in the growth, apoptosis and migration of medullary thyroid carcinoma cells through targeting RET[J]. FEBS Lett, 2014, 588(9): 1644-1651. DOI:10.1016/j.febslet.2014.03.002.
- [14] ZHANG P, LI J F, SONG Y Z, et al. MiR-129-5p inhibits proliferation and invasion of chondrosarcoma cells by regulating SOX4/wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(1): 242-253. DOI:10.1159/000477323.
- [15] 巴彩霞, 郭佳, 白雪峰. 上皮间质转化在宫颈癌侵袭和转移中的作用研究[J]. 中国现代医生, 2016, 54(9): 5-8.
- [16] SONG J, LI Y. MiR-25-3p reverses epithelial-mesenchymal transition via targeting Sema4C in cisplatin-resistance cervical cancer cells[J/OL]. Cancer Sci, 2017, 108(1): 23-31[2019-05-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5276840/>. DOI:10.1111/cas.13104.
- [17] ZHANG Y Z, AN J H, LV W, et al. MiRNA-129-5p suppresses cell proliferation and invasion in lung cancer by targeting microspherule protein 1, E-cadherin and vimentin[J/OL]. Oncol Lett, 2016, 12(6): 5163-5169[2019-05-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5228557/>. DOI:10.3892/ol.2016.5372.
- [18] LUAN Q X, ZHANG B G, LI X J, et al. MiR-129-5p is downregulated in breast cancer cells partly due to promoter H3K27m3 modification and regulates epithelial-mesenchymal transition and multidrug resistance[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(20): 4257-4265.
- [19] LI X W, TUERGAN M, ABULIZI G. Expression of MAPK1 in cervical cancer and effect of MAPK1 gene silencing on epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis[J]. Asian Pac J Trop Med, 2015, 8(11): 937-943. DOI:10.1016/j.apjtm.2015.10.004.
- [20] LI W F, LIANG J J, ZHANG Z C, et al. MicroRNA-329-3p targets MAPK1 to suppress cell proliferation, migration and invasion in cervical cancer[J]. Oncol Rep, 2017, 37(5): 2743-2750. DOI: 10.3892/or.2017.5555.
- [收稿日期] 2019-05-25 [修回日期] 2019-09-05
[本文编辑] 党瑞山