

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.03.009

· 临床研究 ·

miR-96 在子宫内膜癌中表达的变化及其对癌细胞恶性生物学行为的影响

李峰^{1a}, 刘卓², 仇红平^{1b} (1. 山东省聊城市 妇幼保健院 a. 生殖中心, b. 妇产科, 山东 聊城 252000; 2. 山东中医药大学附属医院 妇产科, 山东 济南 250014)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-96 在子宫内膜癌组织和细胞中表达的变化对癌细胞恶性表型的影响及其可能的作用机制。 **方法:** 选取 2016 年 4 月至 2018 年 12 月在我院妇产科接受手术治疗的 76 例子宫内膜癌患者的癌组织标本, 采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测人子宫内膜癌组织和细胞中 miR-96 的表达情况, 并分析 miR-96 的表达与患者临床病理特征的相关性。体外转染 miR-96 inhibitor 至人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞中, qPCR 检测 Ishikawa 细胞中 miR-96 的表达变化, 分别应用 CCK-8 实验、克隆形成实验、流式细胞术、划痕实验和 Transwell 实验检测 Ishikawa 细胞恶性生物学行为的变化, WB 检测 Ishikawa 细胞中 FOXO1 蛋白的表达变化, 双荧光素酶报告基因观察 miR-96 和 FOXO1 的靶向关系。 **结果:** qPCR 结果显示, miR-96 在人子宫内膜癌细胞 JEC、Ishikawa、HEC-1B 和子宫内膜癌组织中异常高表达 (均 $P < 0.01$), 并且 miR-96 表达与患者 FIGO 分期和淋巴结转移密切相关 (均 $P < 0.05$)。转染 miR-96 inhibitor 后, Ishikawa 细胞 miR-96 表达水平明显降低 ($P < 0.01$), 其增殖活性和克隆形成能力明显下降 (均 $P < 0.01$)、凋亡率明显上升 ($P < 0.01$)、划痕愈合率和侵袭穿膜细胞数明显下降 ($P < 0.01$)。双荧光素酶报告基因显示 miR-96 可以直接靶向 FOXO1, WB 结果显示 miR-96 能够负向调控 Ishikawa 细胞 FOXO1 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。 **结论:** miR-96 在子宫内膜癌组织和细胞中异常高表达, 抑制 miR-96 表达能够抑制子宫内膜癌细胞增殖、迁移及侵袭并促进其凋亡, 其机制可能与靶向调控 FOXO1 有关。

[关键词] 子宫内膜癌; Ishikawa 细胞; miR-96; FOXO1; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R737.33; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)03-0275-08

Expression change of miR-96 in endometrial cancer and its effect on malignant biological behaviors of cancer cells

LI Feng^{1a}, LIU Zhuo², ZHANG Hongping^{1b} (1 a. Department of Reproductive Center, b. Department of Obstetrics and Gynecology, Liaocheng Maternal and Child Health Hospital, Liaocheng 252000, Shandong, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression changes of miR-96 in endometrial cancer tissues and cells, and to explore its effect on tumor malignant phenotypes as well as the possible mechanisms. **Methods:** From April 2016 to December 2018, 76 cases of endometrial cancer tissues from 76 patients who were surgically treated in the Department of Obstetrics and Gynecology of our hospital were selected for this study. qPCR was used to detect the expression of miR-96 in human endometrial cancer tissues and cells, and the correlation between the miR-96 expression and the clinicopathological characteristics of patients was analyzed. miR-96 inhibitor was transfected into human endometrial cancer Ishikawa cells *in vitro*. After transfection, the expression of miR-96 in Ishikawa cells was detected by qPCR; the tumor biological behaviors of Ishikawa cells were detected by CCK-8 test, Clone formation test, Flow cytometry, Scratch test and Transwell test; and the FOXO1 protein expression in Ishikawa cells was detected by WB. At the same time, Dual luciferase reporter gene assay was used to observe the targeting relationship between miR-96 and FOXO1. **Results:** The results of qPCR showed that the expression of miR-96 was abnormally high in human endometrial cancer cells (JEC, Ishikawa, HEC-1B) and endometrial cancer tissues (all $P < 0.01$), and the expression of miR-96 was closely related to FIGO stage and lymph node metastasis (all $P < 0.05$). After transfection with miR-96 inhibitor, the expression level of miR-96 in Ishikawa cells decreased significantly ($P < 0.01$), the proliferation activity and clone formation ability decreased significantly (all $P < 0.01$), the apoptotic rate increased significantly

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目(No. 2016WS0583)。Project supported by the Medical and Health Science and Technology Development Plan Project from Shangdong Province (No. 2016WS0583)

[作者简介] 李峰(1982-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事妇产科疾病的基础及临床研究, E-mail: dr_lifeng@yeah.net

[通信作者] 仇红平(ZHANG Hongping, corresponding author), 硕士, 主治医师, 主要从事妇产科疾病的基础及临床研究, E-mail: zhanghongpinglc@aliyun.com

($P < 0.01$), and the scratch healing rate and the number of invasive transmembrane cells decreased significantly ($P < 0.01$). Dual luciferase reporter gene assay showed that miR-96 could directly target FOXO1, and WB showed that miR-96 could negatively regulate FOXO1 protein expression in Ishikawa cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** The expression of miR-96 is abnormally high in endometrial cancer tissues and cells. Inhibiting the expression of miR-96 can inhibit the proliferation, invasion and migration of endometrial cancer cells and promote their apoptosis. The mechanism may be related to the targeted regulation of FOXO1.

[Key words] endometrial cancer; Ishikawa cell; miR-96; FOXO1; proliferation; apoptosis; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(3): 275-282. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2021.03.009]

子宫内膜癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,近年来在世界范围内其发病率居高不下,并且发病年龄趋于年轻化,严重威胁着女性的健康^[1]。随着医学技术的进步,子宫内膜癌的5年生存率有所提高,但是对晚期子宫内膜癌和复发性子宫内膜癌,疗效和预后尚不能令人满意^[2]。子宫内膜癌的发生发展是一个极其复杂的多步骤、多因素、多基因参与的复杂过程,其发生机制至今尚未阐明,因此探索子宫内膜癌的发生发展中起关键作用的基因意义重大。

微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是近年来发现的小分子单链非编码RNA,通过在转录后水平对靶基因进行负调控,在机体及细胞生理及病理生理活动中发挥着重要的作用^[3]。大量异常表达的miRNA参与了恶性肿瘤的发生发展过程,可能成为监测肿瘤发生发展的生物学标志物和治疗靶点^[4]。miR-96是miRNA家族重要成员之一,研究显示miR-96在乳腺癌^[5]、膀胱癌^[6]、食管癌^[7]等多种恶性肿瘤中表达升高,起着促癌基因的作用,但在胶质母细胞瘤^[8]、胰腺癌^[9]等恶性肿瘤中表达降低,起着抑癌基因的作用,提示miR-96在不同的恶性肿瘤中存在明显的异质性,其可能通过调控不同的分子通路发挥作用。miR-96在子宫内膜癌中的表达情况及其作用机制至今尚不清楚,因此本研究试图通过探讨人子宫内膜癌中miR-96的表达变化,观察其对肿瘤细胞恶性表型的影响,为子宫内膜癌的发生发展机制研究和靶向治疗提供新的参考依据。

1 资料与方法

1.1 组织标本和细胞系

选取2016年4月至2018年12月在我院妇产科接受手术治疗且术前未接受放化疗、术后病理确诊为子宫内膜癌的76例患者作为研究对象。另取因子子宫肌瘤在我院妇产科行子宫切除术的40例患者的正常子宫内膜组织作为正常对照。本研究经本院医学伦理委员会批准,患者均知情同意并签署知情同意书。人子宫内膜癌细胞系Ishikawa购自中国科学院上海细胞库,置于DMEM/F12培养基中培养。人子宫内膜上皮细胞ECS和子宫内膜癌细胞系JEC、HEC-1B购自美国ATCC公司,均置于RPMI 1640培

养基中培养。

1.2 主要试剂

Lipofectamine™2000脂质体转染试剂盒购自美国Invitrogen公司,miRNA提取试剂购自美国罗氏公司,miR-96 inhibitor、NC-inhibitor、miR-96 mimics、NC-mimics购自广州锐博生物公司,逆转录试剂盒和qPCR荧光定量试剂盒均购自大连宝生物公司,荧光素酶报告基因质粒FOXO1-WT和FOXO1-MUT购自上海吉玛制药公司,荧光素酶检测试剂盒购自美国Promega公司,CCK-8试剂盒购自日本DOJINDO公司,Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物公司,基质胶购自美国BD公司,Transwell小室购自美国Corning公司,抗FOXO1一抗和辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗购自美国Santa Cruz公司。

1.3 实验分组及细胞转染

收集对数生长期Ishikawa细胞,将细胞密度调整至 1×10^5 个/ml并接种于12孔板,培养24 h后随机分为2组,每组均设3复孔。以Lipofectamine™2000为介质分别转染miR-96 inhibitor和NC-inhibitor至Ishikawa细胞,6 h后将细胞培养液更换为正常细胞培养液继续培养,24 h后收集细胞进行后续实验。

1.4 qPCR检测癌组织和细胞中miR-96的表达水平

使用miRNA提取试剂提取子宫内膜癌组织和细胞总RNA,取100 ng总RNA,按逆转录试剂盒说明书逆转录制备cDNA。取cDNA,按照荧光定量试剂盒说明书配置反应体系及反应参数,反应条件:95 °C 3 min; (95 °C 15 s, 62 °C 1 min, 72 °C 1 min)45个循环。miR-96引物序列:上游为5'-GCCCGCTTTGGCACTAGCACATT-3',下游为5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'。内参U6引物序列:上游为5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3',下游为5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。miR-96的相对表达水平以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.5 CCK-8实验检测各组细胞的增殖能力

收集细胞接种于96孔板,转染后继续培养24、48、72、96 h后向每孔加入10 μ l CCK-8溶液,继续培养3 h后,用酶标仪测定450 nm处光密度(D)值,以此代表细胞的增殖活性。

1.6 克隆形成实验检测细胞的克隆形成能力

收集转染后24 h细胞接种于6孔板,每孔 1×10^3 个

细胞,常规培养1周,PBS洗3遍后多聚甲醛固定20 min,风干,0.1%结晶紫染色20 min,晾干、拍照,在显微镜下计数克隆数(>50个细胞为1个克隆)。

1.7 流式细胞术检测转染后癌细胞凋亡的变化

收集转染后24 h的细胞,PBS清洗2次,参照凋亡试剂盒说明书操作,加入500 μ l预冷的1 \times 结合缓冲液均匀混合细胞,加入10 μ l Annexin V-FITC,室温暗处孵育10 min,加入5 μ l PI混匀染色后,立即上流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。

1.8 划痕实验检测癌细胞的迁移能力

收集转染后24 h的细胞接种于6孔板,继续培养待细胞长至完全汇合,应用10 μ l加样枪头垂直于6孔板直线划痕,PBS冲洗2遍去除因划线而脱落的细胞,继续培养24 h,记录划痕后0和24 h时细胞划痕间距,划痕愈合率=(0 h时划痕间距-24 h时划痕间距)/0 h时划痕间距 \times 100%。

1.9 Transwell实验检测癌细胞的侵袭能力

实验前应用Matrigel胶稀释后预铺Transwell小室的上室面。收集转染后24 h的细胞,以无血清培养基培养饥饿24 h。以无血清培养基重悬细胞,每孔上室加入200 μ l细胞悬液(约含有 1×10^5 个细胞),下室每孔加入600 μ l DMEM培养基(含10%胎牛血清),培养24 h后取出Transwell小室,PBS洗3次,未发生穿膜的细胞用棉拭子从上室面拭去,0.1%结晶紫染色,PBS冲洗干净。高倍显微镜下计数穿膜细胞数,取均值。

1.10 WB检测细胞中FOXO1蛋白水平

取转染后24 h的细胞,PBS洗3次,RIPA裂解各组细胞提取总蛋白,并测浓度。细胞总蛋白经10%十二

烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,凝胶上的蛋白转至硝酸纤维膜,加50 mg/ml脱脂奶粉封闭液封闭1 h,分别加入一抗FOXO1抗体(工作浓度1:1 000)和GAPDH抗体(工作浓度1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST缓冲液洗3次,加入HRP标记的二抗(工作浓度1:2 000),室温反应2 h后,加入增强型化学发光试剂ECL,曝光、显影,Image J软件分析各条带的灰度值。

1.11 双荧光素酶报告基因实验验证miR-96的靶基因

收集细胞接种于24孔板中,用LipofectamineTM2000,将野生型FOXO1荧光素酶报告基因质粒FOXO1-WT及突变型荧光素酶报告基因质粒FOXO1-MUT,分别与miR-96 mimics及NC-mimics共转染入Ishikawa细胞,转染24 h后收集细胞,按照荧光素酶检测试剂盒说明书操作检测,计算各组细胞的相对荧光素酶活性。

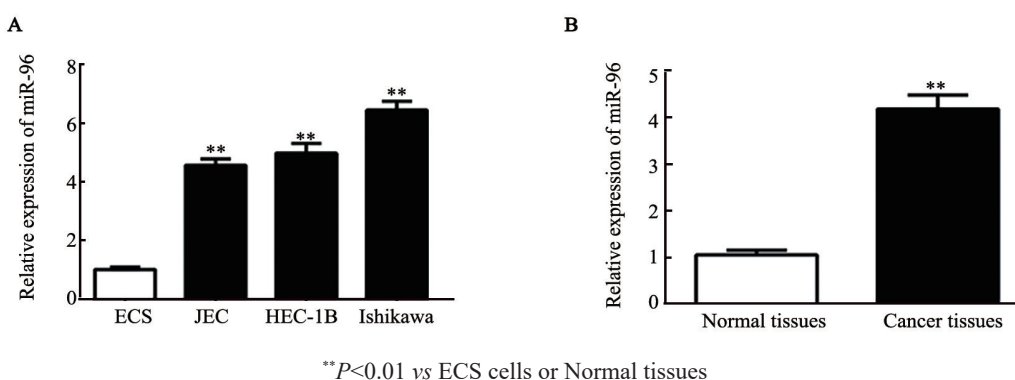
1.12 统计学处理

1.4~1.11各实验均复重复3次。采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析,计数资料以频数和百分率表示,采用 χ^2 检验进行比较;正态分布计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验或单因素方差分析进行比较。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-96在子宫内膜癌组织和细胞中呈高表达

如图1A所示,miR-96在人子宫内膜癌细胞JEC、Ishikawa、HEC-1B中的表达水平明显高于人子宫内膜上皮细胞ECS(均 $P<0.01$);如图1B所示,miR-96在子宫内膜癌组织中的表达明显高于正常子宫内膜组织($P<0.01$)。



A: Expression of miR-96 in ECS, JEC, Ishikawa and HEC-1B cells;

B: Expression of miR-96 in endometrial cancer tissues and normal endometrial tissues

图1 qPCR检测子宫内膜癌细胞和组织中miR-96的表达水平

Fig.1 Detection of miR-96 expression in endometrial cancer cells and tissues by qPCR

2.2 miR-96表达与子宫内膜癌患者临床病理参数的相关性

以子宫内膜癌组织中miR-96的中位值(4.19)为截断值,分为高表达组患者38例和低表达组患者38

例。如表1所示,miR-96的表达水平与FIGO分期和淋巴结转移密切相关($P<0.05$),而与患者年龄、组织学分级、肌层浸润深度及病理类型无关($P>0.05$)。

表1 miR-96表达与患者临床病理特征的关系

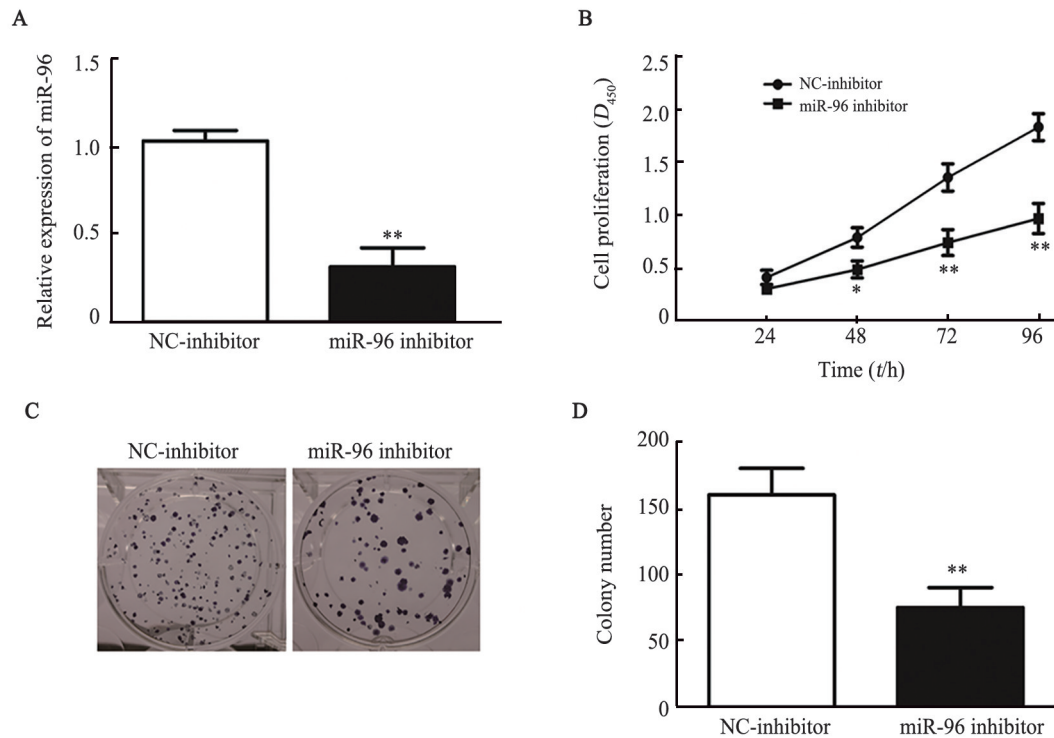
Tab.1 Correlation between miR-96 expression and clinicopathological features of patients

Characteristic	N	Low expression(n)	High expression(n)	χ^2 value	P value
Age (t/a)				0.054	0.817
≥ 50	43	22	21		
< 50	33	16	17		
Depth of myometrial invasion				0.864	0.353
$\leq 1/2$	44	24	20		
$> 1/2$	32	14	18		
Histological grading				2.850	0.091
G1-G2	60	27	33		
G3	16	11	5		
Pathological type				1.134	0.287
Endometrioid carcinoma	67	35	32		
Non endometrioid carcinoma	9	3	6		
FIGO staging				4.413	0.036
I	31	20	11		
II-III	45	18	27		
Lymph node metastasis				5.684	0.017
Yes	19	5	14		
No	57	33	24		

2.3 下调miR-96对Ishikawa细胞增殖活性和克隆形成能力的影响

如图2A所示,转染后,miR-96 inhibitor组Ishikawa细胞miR-96的表达水平明显低于NC-inhibitor组($P < 0.01$)。CCK-8实验结果如图2B所示,

与NC-inhibitor组比较,miR-96 inhibitor组细胞的增殖活性明显降低($P < 0.01$)。克隆形成实验结果如图2C、2D所示,与NC-inhibitor组比较,miR-96 inhibitor组细胞的克隆形成能力明显降低($P < 0.01$)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC-inhibitor

A: Transfection of miR-96 inhibitor could inhibit the expression of miR-96 in Ishikawa cells; B: CCK-8 assay showed that downregulation of miR-96 inhibited the proliferation of Ishikawa cells; C and D: Clone formation test showed that downregulation of miR-96 inhibited the colony formation ability of Ishikawa cells

图2 miR-96对Ishikawa细胞增殖活性和克隆形成能力的影响

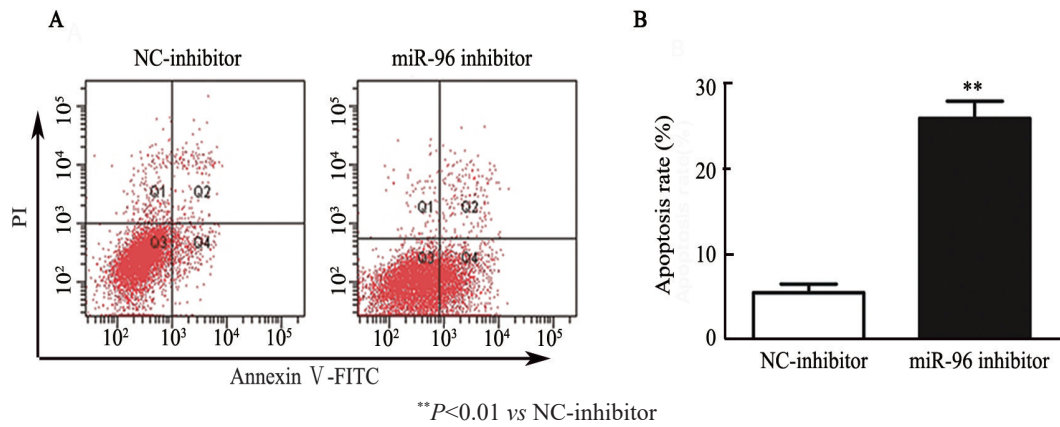
Fig.2 The effect of miR-96 on the proliferation and colony formation ability of Ishikawa cells

2.4 下调miR-96对Ishikawa细胞凋亡率的影响

流式细胞术实验结果如图3所示,与NC-inhibitor组比较,miR-96 inhibitor组细胞的凋亡率明显升高($P<0.01$)。

2.5 下调miR-96对Ishikawa细胞迁移和侵袭能力的影响

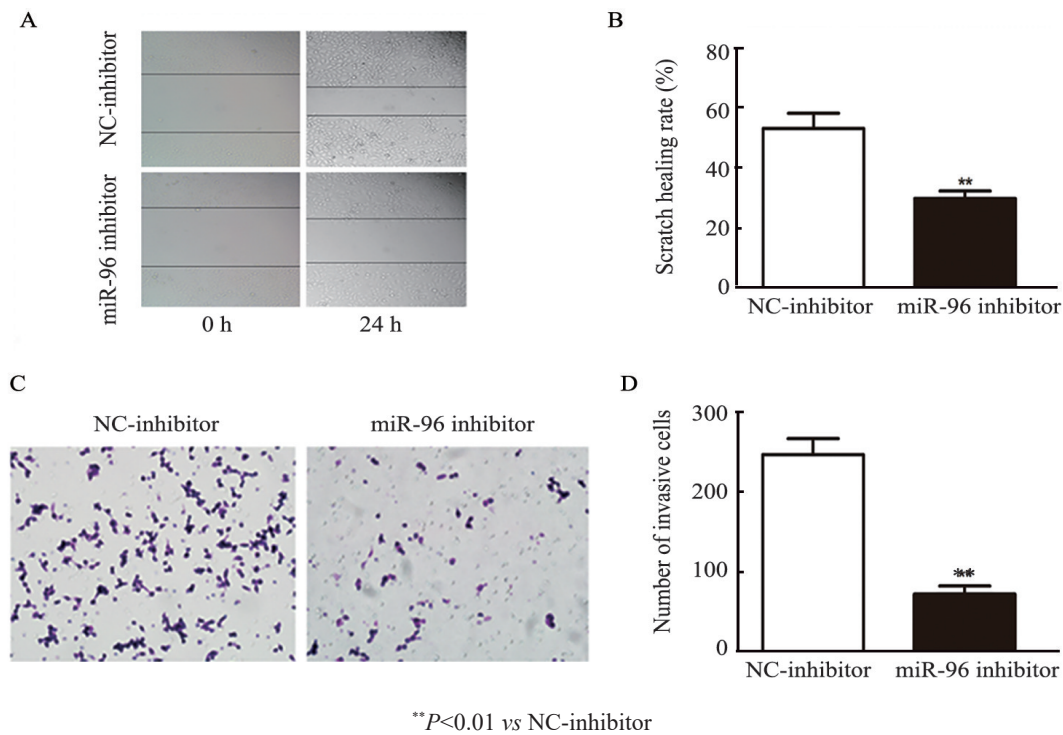
划痕实验结果如图4A、4B所示,与NC-inhibitor组比较,miR-96 inhibitor组细胞的划痕愈合率明显降低($P<0.01$);Transwell实验结果如图4C、4D所示,与NC-inhibitor组比较,miR-96 inhibitor组穿膜细胞数明显降低($P<0.01$)。



A and B: Flow cytometry showed that downregulation of miR-96 increased the apoptosis rate of Ishikawa cells

图3 miR-96对Ishikawa细胞凋亡率的影响

Fig.3 The effect of miR-96 on the apoptosis rate of Ishikawa cells



A and B: Scratch assay showed that downregulation of miR-96 inhibited the migration of Ishikawa cells; C and D: Transwell assay showed that downregulation of miR-96 inhibited the invasion of Ishikawa cells ($\times 200$)

图4 miR-96对Ishikawa细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig.4 The effect of miR-96 on the migration and invasion of Ishikawa cells

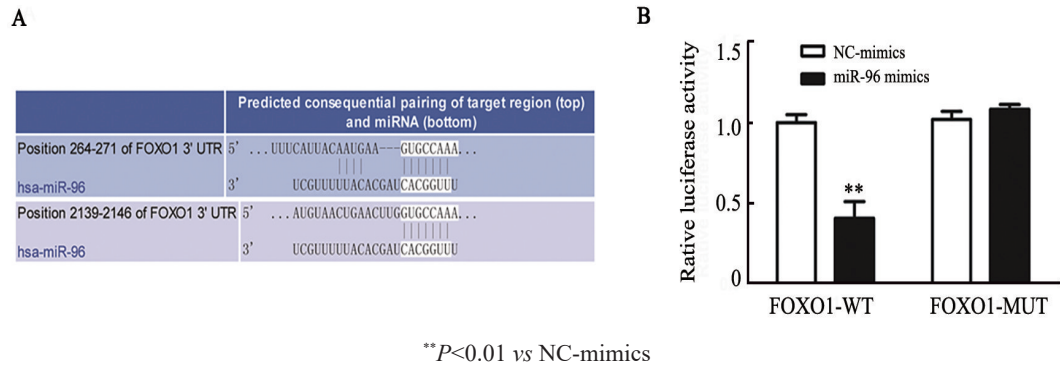
2.6 miR-96靶基因是FOXO1

生物信息学网站 TargetScan (www.targetscan.org)显示,miR-96与FOXO13'UTR区存在种子序列

互补的结合位点(图5A)。双荧光素酶活性检测结果如图5B显示,共转染miR-96 mimics和FOXO1-WT的Ishikawa细胞荧光素酶活性明显降低($P<0.01$),而

共转染 miR-96 mimics 和 FOXO1-MUT 的 Ishikawa 细胞荧光素酶活性无明显变化 ($P>0.05$), 以上结果提示

FOXO1 是 miR-96 的直接作用靶基因。



A: Pairing alignments of FOXO1 and miR-96; B: Statistical results of relative luciferase activity in each group

图5 miR-96 靶基因预测及其验证

Fig.5 Prediction and validation of miR-96 target genes

2.7 miR-96 对 Ishikawa 细胞 FOXO1 蛋白表达的影响

为了进一步明确 miR-96 是否能够调控 FOXO1 蛋白的表达, 分别转染 miR-96 mimics 和 miR-96 inhibitor 至 Ishikawa 细胞。WB 结果如图 6 所示, miR-96 mimics 组细胞 FOXO1 蛋白表达明显低于 NC-mimics 组 [(0.28±0.09) vs (0.91±0.11), $P<0.01$], miR-96 inhibitor 组细胞 FOXO1 蛋白表达明显高于 NC-inhibitor 组 [(1.16±0.14) vs (0.32±0.10), $P<0.01$].

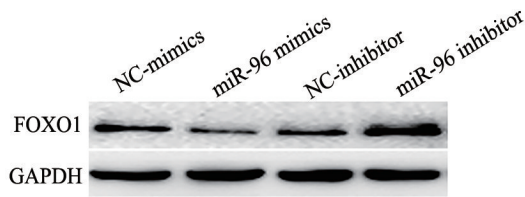


图6 WB 检测 miR-96 对 Ishikawa 细胞 FOXO1 蛋白表达的影响
Fig.6 The effect of miR-96 on FOXO1 protein expression in Ishikawa cells detected by WB

3 讨论

子宫内膜癌是女性死亡率最高的生殖系统恶性肿瘤之一, 目前常用的手术治疗、激素治疗、放化疗对子宫内膜癌, 尤其是晚期或者复发性患者的治疗效果不能令人满意。恶性肿瘤的发生发展是细胞增殖与凋亡失衡所致^[10]。目前肿瘤研究的方向就是抑制肿瘤细胞增殖、侵袭及诱导其凋亡。近年来研究^[11]显示 miRNA 在子宫内膜癌的增殖、凋亡、侵袭和转移等方面发挥着重要的调节作用。LI 等^[12]发现 miR-218 在子宫内膜癌中表达降低, 上调 miR-218 能够抑制子宫内膜癌细胞的转移及侵袭。miR-944 可

以通过调控 CADM2 促进子宫内膜癌细胞的增殖并抑制其凋亡, 高表达 miR-944 的子宫内膜癌患者预后较差^[13]。

miR-96 是近年来新发现的 miRNA 重要成员之一, 属于 miR-183 家族, 其定位于染色体 7q32.2。miR-96 在不同恶性肿瘤发生进展中所起的作用不尽相同。在非小细胞肺癌组织和细胞中, miR-96 表达上调, 可以通过靶向 Gpc3 基因促进细胞的侵袭和迁移, 起癌基因的作用^[14]。然而, 在人骨肉瘤中, miR-96 起抑癌基因的作用, 通过抑制 EZRIN 基因抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及肿瘤形成能力, 提高细胞凋亡率^[15]。但目前有关 miR-96 在子宫内膜癌中的表达及作用机制尚不清楚。本研究通过 qPCR 发现, miR-96 在子宫内膜癌组织和细胞中异常高表达, 并且与 FIGO 分期和淋巴结转移密切相关, 说明 miR-96 在子宫内膜癌的发生进展中可能起着癌基因的作用。为了进一步研究 miR-96 对子宫内膜癌细胞增殖、克隆形成、凋亡及迁移、侵袭等恶性表型的影响, 通过转染 miR-96 抑制物降低 Ishikawa 细胞中 miR-96 的表达, 转染后的 Ishikawa 细胞增殖活性和克隆形成能力明显下降、凋亡率明显上升, 划痕愈合率和侵袭穿膜细胞数明显下降, 说明抑制 miR-96 的表达能够抑制子宫内膜癌的恶性表型从而控制其进展, 进一步证实 miR-96 在子宫内膜癌的发生进展中起着癌基因的作用。

miRNA 通过调控下游靶基因参与机体及细胞的各项功能调节。GUO 等^[16]发现在膀胱癌细胞中, miR-96 通过调控 FOXO1 表达调控肿瘤细胞的凋亡。在前列腺癌^[17-18]、甲状腺癌^[19]、乳腺癌^[20]等肿瘤中也发现, miR-96 通过调控 FOXO1 基因发挥作用。本研究通过生物学信息网站 TargetScan 发现, miR-96 与

FOXO13'UTR 区存在理论上种子序列互补的结合位点。双荧光素酶活性实验发现,上调 Ishikawa 细胞 miR-96 表达可明显抑制野生型 FOXO1-WT 基因报告载体的荧光素酶活性,而对突变型 FOXO1-MUT 基因报告载体的荧光素酶活性无明显影响。进一步 WB 检测结果显示,miR-96 能够负向调控 Ishikawa 细胞中 FOXO1 蛋白的表达,以上结果说明 FOXO1 是 miR-96 的直接作用靶基因。

FOXO1 是叉头转录因子 FOXO 亚家族重要成员之一,也称为 FOXO1a,在调控细胞增殖、分化、凋亡和血管生成等方面发挥中极其重要的作用^[21],是目前 FOXO 亚家族研究最多的成员。目前已经公认 FOXO1 作为一种肿瘤抑制因子抑制恶性肿瘤的发生发展^[22]。早在 2008 年 GOTO 等学者^[23]就报道 Ishikawa 细胞中 FOXO1 表达的缺失促进了癌细胞不可控制的增殖。KORANI 等^[24]在研究中已证实子宫内膜癌组织和细胞中 FOXO1 表达水平明显降低。WARD 等^[25]在研究中也报道了 FOXO1 在子宫内膜癌组织和 ECC1、Hec1B、Ishikawa、RL95 等细胞中表达缺失,并且 FOXO1 的缺失与 Ishikawa 细胞的增殖、细胞周期及凋亡有关。目前研究还发现 FOXO1 表达的缺失与 Ishikawa 细胞的孕激素和化疗药物抵抗有关^[26-27]。至今,国内外已经有较多的实验研究证实上调 FOXO1 能够抑制子宫内膜癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并促进其凋亡^[28-30]。因此说明 miR-96 对子宫内膜癌细胞恶性表型的抑制作用可能是通过负调控 FOXO1 基因来实现的。

总之,miR-96 在子宫内膜癌中异常高表达,抑制 miR-96 表达能够抑制癌细胞的增殖、侵袭及迁移,并促进其凋亡,其机制可能与靶向调控 FOXO1 有关,实验结果为子宫内膜癌的发生发展机制及靶向治疗研究提供了新的方向。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21654.
- [2] MILLER K D, SIEGEL R L, LIN C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(4): 271-289. DOI: 10.3322/caac.21349.
- [3] SOREL O, DEWALS B G. MicroRNAs in large herpesvirus DNA genomes: recent advances[J]. *Biomol Concepts*, 2016, 7(4): 229-239. DOI: 10.1515/bmc-2016-0017.
- [4] RUPAIMOOLE R, SLACK F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 203-222. DOI: 10.1038/nrd.2016.246.
- [5] HONG Y, LIANG H, UZAIR-UR-REHMAN, et al. miR-96 promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting PTPN9 in breast cancer[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37421[2020-08-21]. <https://www.nature.com/articles/srep37421>. DOI: 10.1038/srep37421.
- [6] WU Z, LIU K, WANG Y, et al. Upregulation of microRNA-96 and its oncogenic functions by targeting CDKN1A in bladder cancer[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2015, 15: 107 [2020-08-21]. <https://cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-015-0235-8>. DOI: 10.1186/s12935-015-0235-8.
- [7] XIA H, CHEN S, CHEN K, et al. MiR-96 promotes proliferation and chemo- or radioresistance by down-regulating RECK in esophageal cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(8): 951-958. DOI: 10.1016/j.biopha.2014.10.023.
- [8] FENG S, YAO J, ZHANG Z, et al. miR-96 inhibits EMT by targeting AEG-1 in glioblastoma cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2964-2972. DOI: 10.3892/mmr.2017.8227.
- [9] HUANG X, LV W, ZHANG J H, et al. miR-96 functions as a tumor suppressor gene by targeting NUA1 in pancreatic cancer[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6): 1599-1605. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1940.
- [10] SHIBATA T, NOGUCHI T, TAKENO S, et al. Disturbed XIAP and XAF1 expression balance is an independent prognostic factor in gastric adenocarcinomas[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(12): 3579-3587. DOI: 10.1245/s10434-008-0062-4.
- [11] VASILATOU D, SIOULAS V D, PAPPAS V, et al. The role of miRNAs in endometrial cancer[J]. *Epigenomics*, 2015, 7(6): 951-959. DOI: 10.2217/epi.15.41.
- [12] LI X C, HAI J J, TAN Y J, et al. miR-218 suppresses metastasis and invasion of endometrial cancer via negatively regulating ADD2[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(4): 1408-1417. DOI: 10.26355/eurrev_201902_17097.
- [13] HE Z, XU H, MENG Y, et al. miR-944 acts as a prognostic marker and promotes the tumor progression in endometrial cancer[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 88: 902-910[2020-08-24]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332216327639?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.01.117.
- [14] FEI X, ZHANG J, ZHAO Y, et al. miR-96 promotes invasion and metastasis by targeting GPC3 in non-small cell lung cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 9081-9086. DOI: 10.3892/ol.2018.8507.
- [15] YAO Q, PEI Y, ZHANG X, et al. microRNA-96 acts as a tumor suppressor gene in human osteosarcoma via target regulation of EZRIN[J/OL]. *Life Sci*, 2018, 203: 1-11 [2020-08-24]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320518301930?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.04.012.
- [16] GUO Y, LIU H, ZHANG H, et al. miR-96 regulates FOXO1-mediated cell apoptosis in bladder cancer[J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(3): 561-565. DOI: 10.3892/ol.2012.775.
- [17] YU J J, WU Y X, ZHAO F J, et al. miR-96 promotes cell proliferation and clonogenicity by down-regulating of FOXO1 in prostate cancer cells[J/OL]. *Med Oncol*, 2014, 31(4): 910 [2020-09-02]. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12032-014-0910-y>. DOI: 10.1007/s12032-014-0910-y.
- [18] HAFLIDADÓTTIR B S, LARNE O, MARTIN M, et al. Upregulation of miR-96 enhances cellular proliferation of prostate cancer cells through FOXO1[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72400 [2020-09-02]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0072400>. DOI: 10.1371/journal.pone.0072400.
- [19] SONG H M, LUO Y, LI D F, et al. MicroRNA-96 plays an oncogenic role by targeting FOXO1 and regulating AKT/FOXO1/

- Bim pathway in papillary thyroid carcinoma cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 9889-9900.
- [20] GUTTILLA I K, WHITE B A. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(35): 23204-23216. DOI: 10.1074/jbc.M109.031427.
- [21] ZHAO Y, WANG Y, ZHU W G. Applications of post-translational modifications of FOXO family proteins in biological functions[J]. *J Mol Cell Biol*, 2011, 3(5): 276-282. DOI: 10.1093/jmcb/mjr013.
- [22] 金益, 邵钦树. FOXO1 基因在肿瘤中的研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2015, 21(2): 81-85. DOI: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.02.B001.
- [23] GOTO T, TAKANO M, ALBERGARIA A, et al. Mechanism and functional consequences of loss of FOXO1 expression in endometrioid endometrial cancer cells[J]. *Oncogene*, 2008, 27(1): 9-19. DOI: 10.1038/sj.onc.1210626.
- [24] KORANI M, FALLAH S, TEHRANIAN A, et al. The evaluation of the FOXO1, KLF9 and YT521 genes expression in human endometrial cancer[J]. *Clin Lab*, 2013, 59(5/6): 483-489. DOI: 10.7754/clin.lab.2012.120626.
- [25] WARD E C, HOEKSTRA A V, BLOK L J, et al. The regulation and function of the forkhead transcription factor, Forkhead box O1, is dependent on the progesterone receptor in endometrial carcinoma [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(4): 1942-1950. DOI: 10.1210/en.2007-0756.
- [26] WANG Y, ZHANG L, CHE X, et al. Roles of SIRT1/FOXO1/SREBP-1 in the development of progesterin resistance in endometrial cancer[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2018, 298(5): 961-969. DOI: 10.1007/s00404-018-4893-3.
- [27] HOEKSTRA A V, WARD E C, HARDT J L, et al. Chemosensitization of endometrial cancer cells through AKT inhibition involves FOXO1 [J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 108(3): 609-618. DOI: 10.1016/j.ygyno.2007.11.007.
- [28] ZHANG Y, ZHANG L, SUN H, et al. Forkhead transcription factor 1 inhibits endometrial cancer cell proliferation via sterol regulatory element-binding protein 1[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(2): 731-737. DOI: 10.3892/ol.2016.5480.
- [29] FANG Q, SANG L, DU S. Long noncoding RNA LINC00261 regulates endometrial carcinoma progression by modulating miRNA/FOXO1 expression[J]. *Cell Biochem Funct*, 2018, 36(6): 323-330. DOI: 10.1002/cbf.3352.
- [30] 乐珍, 沈君菁, 黄启涛, 等. miR-135b 通过靶向 FOXO1 促进子宫内膜癌细胞的增殖[J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(5): 675-680. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.05.015.

[收稿日期] 2020-11-22

[修回日期] 2021-01-25

[本文编辑] 沈志超