

VEGF-C调节miR-145/SIP1增强宫颈癌细胞侵袭能力

程 杨, 顾正田

(广州市第一人民医院妇产科, 广东 广州 510180)

摘要:【目的】研究VEGF-C促宫颈癌细胞侵袭能力的影响,探讨microRNA-145/Smad相互作用蛋白1在其中的作用。【方法】体外培养宫颈癌细胞株SiHa细胞,观察VEGF-C对miR-145、SIP1表达的影响;转染SIP1 siRNA后,采用transwell侵袭小室法观察其对宫颈癌细胞株增殖和侵袭的影响。【结果】VEGF-C(100 ng/mL)处理SiHa细胞12、24、48 h后,均能抑制miR-145表达,与对照组比较,其表达幅度分别为(82.4±6.4)% ($P<0.05$)、(72.5±7.2)% ($P<0.01$)、(60.6±9.6)% ($P<0.001$)。同时,VEGF-C处理后可增强SIP1蛋白表达,与对照组(100%)比较,表达幅度分别为(142.4±16.5)% ($P<0.05$)、(183.6±11.4)% ($P<0.01$)、(220.8±15.7)% ($P<0.001$)。miR-145类似物(mimic)可显著抑制VEGF-C促SIP1表达的效应。SiHa细胞转染特异性SIP1 siRNA 48 h后,VEGF-C促细胞侵袭的能力明显减弱,抑制率为(56.6±10.3)% ($P<0.01$)。【结论】VEGF-C可能下调miR-145,进而上调SIP1蛋白表达,增强宫颈癌侵袭能力及其恶性进展。

关键词:宫颈癌;血管内皮生长因子C;microRNA-145;Smad相互作用蛋白1;侵袭

中图分类号:R737.33

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2018)02-0215-05

VEGF-C Promotes Cervical Cancer Invasion via Regulation of microRNA-145/Smad Interacting Protein 1

CHENG Yang, GU Zheng-tian

(Department of Gynecology and Obstetrics, The First People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, China)

Corresponding to: GU Zheng-tian, E-mail: guzhengtian@yahoo.cn

Abstract: 【Objective】 To investigate the role of microRNA-145/Smad interacting protein 1 (SIP 1) in VEGF-C-enhanced cervical cancer metastasis. 【Methods】 Cervical cancer cell line SiHa cells were cultured and treated with VEGF-C to observe its effect on the expression of miR-145 and SIP1. After transfection with specific SIP1 siRNA, the invasion number of cultured cells were calculated by transwell chamber assay. 【Results】 Treatment with VEGF-C (100 ng/mL) for 12 h, 24 h and 48 h all reduced miR-145 expression, with the expression abundance of (82.4±6.4)% ($P<0.05$), (72.5±7.2)% ($P<0.01$), and (60.6±9.6)% ($P<0.001$), respectively, when compared to control. Meanwhile, the same treatment with VEGF-C also increased SIP1 protein expression, with the expression abundance of (142.4±16.5)% ($P<0.05$), (183.6±11.4)% ($P<0.01$) and (220.8±15.7)% ($P<0.001$), respectively. The transfection of miR-145 mimic significantly impaired VEGF-C effect on SIP1 expression. Finally, VEGF-C promoted SiHa cell invasion, which was largely inhibited by the transfection of SIP siRNA with the inhibitory rate of (56.6±10.3)% ($P<0.01$). 【Conclusion】 VEGF-C downregulates miR-145, thus increases SIP1 expression and promotes cervical cancer cell invasion, which may contribute to cervical cancer malignant progression.

Key words: cervical cancer; vascular endothelial growth factor C; microRNA-145; Smad interacting protein 1; invasion

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(2): 215-219]

收稿日期:2017-12-13

基金项目:广东省医学科研基金(A2015058),广州市科技计划项目(2014J4100113),广东省科技计划项目(2013B021800068)

作者简介:程杨,硕士,医师,研究方向:妇科肿瘤,E-mail: 391031160@qq.com;顾正田,通信作者,教授,主任医师,硕士生导师,研究方向:妇科肿瘤,E-mail: guzhengtian@yahoo.cn

子宫颈癌是以上皮非典型增生、原位癌及浸润癌逐渐持续发展的病变。由于HPV疫苗的研发及临床应用,目前宫颈癌的发病率和死亡率呈下降趋势^[1]。但是在发展中国家,宫颈癌依然是比较常见的妇科恶性肿瘤,其浸润和远处转移是造成妇科肿瘤患者死亡的重要原因之一^[2]。因此,进一步深入研究宫颈癌恶性进展的分子机制,对于宫颈癌的治疗策略选择、预后判断等均具有重要的指导价值。MicroRNA(miRNA)是机体内源基因所编码的长度约22个核苷酸的非编码单链RNA分子,在体内参与基因的转录后调控^[3]。近年来的研究表明:多种肿瘤组织中均存在mi-croRNA的表达异常^[4]。例如在宫颈癌组织中,miR-200a和miR-9的表达异常可改变宫颈癌的侵袭能力,其变化程度可用于预测患者预后^[5]。最新研究表明:miR-145可通过下调SIP1(Smad interacting protein 1, SIP1),增强宫颈癌细胞侵袭^[6]。但是,VEGF-C(Vascular endothelial growth factor C)是否通过此途径调节宫颈癌细胞侵袭能力,有待进一步研究。本研究在培养的宫颈癌细胞株SiHa细胞上,观察VEGF-C对miR-145/SIP1途径的调控作用,并明确该途径在VEGF-C促宫颈癌侵袭中的作用。

1 材料与方法

1.1 宫颈癌SiHa细胞株培养

本实验采用的宫颈癌SiHa细胞株来源于武汉大学典藏中心。细胞单层贴壁培养,培养液为RPMI 1640(含100 mL/L胎牛血清、200 mmol/L谷氨酰胺、10 mg/mL青霉素及10 000 U链霉素)。

1.2 siRNA转染

细胞传代培养,生长至50%融合后,加入OPTIMEM培养液培养12 h。SIP1 siRNA(购自Santa cruz, # sc-38641, 50 nmol/L)或阴性对照 siRNA(购自Santa cruz, # sc-37007, 50 nmol/L), miR-145 control或mimic(购置广州锐博公司, 100 nmol/L)均采用lipofectamine(invitrogen)作为载体转染入细胞后,换用OPTIMEM培养液(含10%胎牛血清),转染48 h后提取蛋白,检测转染效率。

1.3 免疫印迹法

细胞经处理后提取蛋白裂解液。进行蛋白定

量后按每孔30 μg蛋白上样行SDS-PAGE电泳、转膜。TBST溶液室温封闭1 h后,与抗SIP1单克隆抗体(购自Santa cruz, # sc-271984) 4℃孵育过夜,洗膜后与二抗室温孵育1 h, ECL反应显色,在凝胶图像分析仪(Bio-rad公司)下拍照,并对条带感光密度进行定量分析。

1.4 细胞侵袭实验

Transwell侵袭小室购自Corning公司(# 3380)。Transwell上室聚碳酸酯膜(膜孔径0.4 μm)以1 mg/mL的matrigel 100 μL室温孵育1 h。胰酶消化细胞后吹打均匀,细胞计数仪下调整密度为 1×10^5 个/mL,取细胞悬液200 μL,接种于Transwell上室内,下室加入RPMI 1640培养液(含10%胎牛血清)500 μL。待细胞贴壁完全后,换用不含抗生素的OPTIMEM培养液培养, siRNA转染48 h后,上、下室均换用常规RPMI 1640培养基,继续以VEGF-C处理24 h。处理完毕后用抹去滤膜上层细胞,以甲醇固定滤膜, Giemsa染色并在光镜下观察不同视野(膜上、下、左、右、中)的侵袭膜细胞数目,取平均值计数。

1.5 统计学方法

定量结果均用均数±标准差(Mean±SD)表示。以SPSS软件9.0进行单因素方差分析(One Way ANOVA)以检验各组之间差异, $P < 0.05$ 被认为有统计学差异。

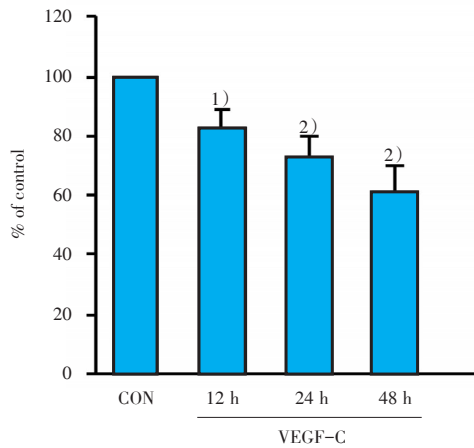
2 结果

2.1 VEGF-C下调SiHa细胞中miR-145表达

在培养的宫颈癌SiHa细胞株上, VEGF-C(100 ng/mL)处理细胞12、24和48 h后($n=3$), 均能抑制miR-145表达(方差分析检验统计量 F 值=5.454)。与对照组(100%)比较, miR-145表达幅度分别为(82.4±6.4)% ($P < 0.05$)、(72.5±7.2)% ($P < 0.01$)、(60.6±9.6)% ($P < 0.001$; 图1)。VEGF-C各处理组之间无明显统计学差异。

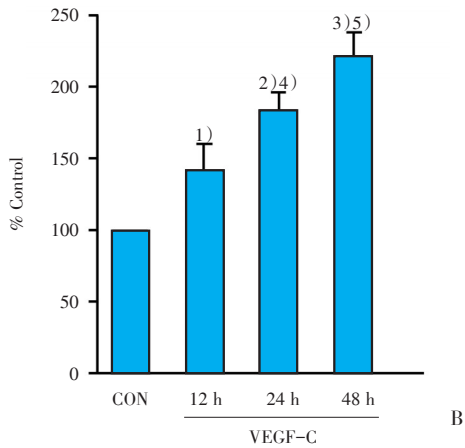
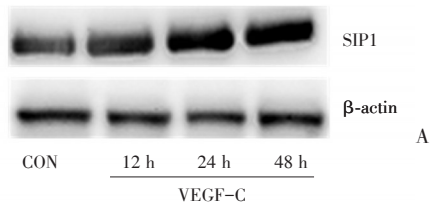
2.2 VEGF-C上调SiHa细胞中SIP1蛋白表达

在培养的宫颈癌SiHa细胞株上, 与对照组比较, VEGF-C(100 ng/mL)处理细胞12、24和48 h后($n=3$), 均能增强SIP1蛋白表达(图2A、B; 方差分析检验统计量 F 值=20.726), 其增加幅度分别为(142.4±16.5)% ($P < 0.05$)、(183.6±11.4)% ($P < 0.01$)、(220.8±15.7)% ($P < 0.001$; 图2B)。



1) $P < 0.05$ vs control, 2) $P < 0.01$ vs control. CON: control group. VEGF-C: 100 ng/mL

图1 VEGF-C下调 SiHa 细胞中 miR-145 表达
Fig.1 VEGF-C reduces miR-145 expression in cultured SiHa cells

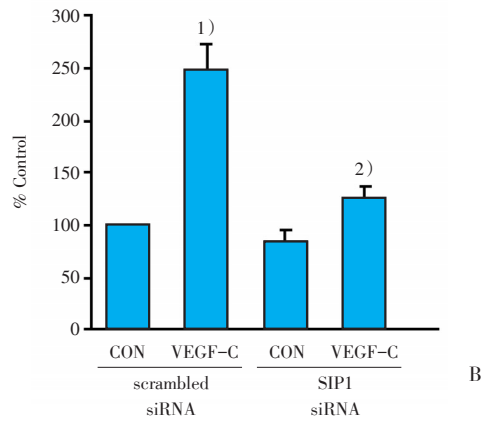
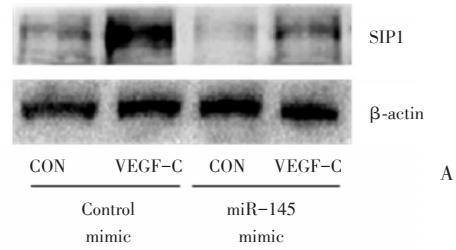


A: The representative picture of SIP1 expression. B: Statistics of band intensity of SIP1 expression in each group. 1) $P < 0.05$ vs control, 2) $P < 0.01$ vs control. 3) $P < 0.001$ vs control. 4) $P < 0.05$ vs VEGF-C 12 h group. 5) $P < 0.01$ vs VEGF-C 12 h group. CON: control group. VEGF-C: 100 ng/mL.

图2 VEGF-C上调 SiHa 细胞中 SIP1 蛋白表达
Fig.2 VEGF-C increases SIP1 protein expression in cultured SiHa cells

SIP1 为 miR-145 的调控靶点^[6]。在 SiHa 细胞中转染 miR-145 类似物 (mimic) 后, 可显著抑制

VEGF-C 作用 48 h 促 SIP1 表达的效应, 抑制率达 $(70.4 \pm 10.8)\%$ ($n=3, F=58.188, P < 0.001$; 图 3A、B)。



A: The representative picture of SIP1 expression. Ve: VEGF-C, 100ng/mL. B: Statistics of band intensity of SIP1 expression in each group. 1) $P < 0.001$ vs. control in scrambled siRNA group. 2) $P < 0.001$ vs. VEGF-C in scrambled siRNA group. CON: control group.

图3 miR-145类似物抑制 VEGF-C 上调 SIP1 蛋白表达的效应

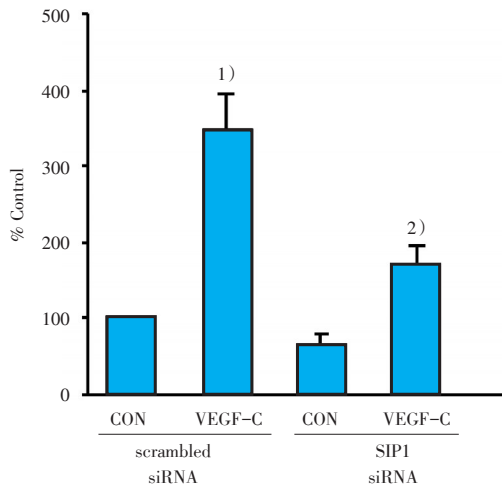
Fig.3 miR-145 reverses VEGF-C-increased SIP1 protein expression in cultured SiHa cells

2.3 SIP1 介导 VEGF-C 促 SiHa 细胞侵袭的效应

与我们以往报道一致, 与对照组比较 ($n=3$), VEGF-C 可显著增强 SiHa 细胞侵袭基质的能力, 侵袭细胞数目增加 $(348.6 \pm 45.8)\%$ ($P < 0.01$)。在 SiHa 细胞中转染 SIP1 siRNA 后, VEGF-C 促侵袭细胞数目明显降低至 $(168.6 \pm 25.8)\%$ ($P < 0.01$, 方差分析检验统计量 F 值=66.85; 图 4)。

3 讨论

宫颈癌为女性常见的恶性肿瘤, 其发病率仅次于乳腺癌, 全世界每年新发病例约 50 万, 严重影响女性身心质量, 给家庭和社会带来沉重负担^[7]。随着宫颈疫苗在临床上的推广应用, 宫颈



1) $P < 0.001$ vs control (CON) in scrambled group, 2) $P < 0.01$ vs VEGF-C in scrambled group.

图4 SIP1介导VEGF-C促SiHa细胞侵袭
Fig.4 VEGF-C increases cell invasion via SIP1

癌的患病率逐年降低。同时随着治疗策略的不断优化,宫颈癌患者的死亡率也大幅度下降。但是目前依然有很多患者预后不良,其主要原因即为肿瘤向远处组织器官的转移。宫颈癌患者5年生存率,与是否存在淋巴结转移密切相关,有淋巴结转移者预后较差^[8]。因此,进一步深入研究宫颈癌恶性进展的分子机制,对于宫颈癌的治疗策略选择、预后判断等均具有重要的指导价值。

宫颈癌的发生发展,经历上皮非典型增生、原位癌及浸润癌等渐变过程,在此期间体内外多种因素均可对其进程进行调控。VEGF-C作为一种特异性的促血管、淋巴管生成因子,对宫颈癌的生长及转移具有重要增强作用^[9]。我们的前期研究表明,VEGF-C可直接作用于宫颈癌细胞本身,增强宫颈癌的转移^[10],但其机制尚有待深入研究。本研究表明,VEGF-C可通过调控SIP1,增强宫颈癌的侵袭能力,这为VEGF-C的作用机制提供了新的见解。

SIP1为具有锌指结构的双臂蛋白,属于 δ EF1

(δ -crystallin enhancer-binding factor 1)家族成员,可与smad蛋白交互作用,增强恶性肿瘤细胞的侵袭和转移能力,同时参与维持癌性干细胞的干性,在多种肿瘤组织(肺癌,乳腺癌等)的恶性进展中均发挥重要作用^[11]。例如SIP1可通过smad途径抑制E-cadherin介导的细胞间黏附作用,可增加基质金属蛋白酶MMP-1/2等表达等作用,强化肿瘤的侵袭能力。在宫颈癌中,SIP1可增强宫颈癌细胞侵袭^[6],这与我们的结果一致,提示SIP1有可能作为宫颈癌肿瘤治疗的靶蛋白。

MicroRNA (miRNA)主要参与转录后基因表达调控,在多种疾病,尤其是肿瘤中发挥重要的调控作用^[4]。例如在宫颈癌组织中,miR-200a和miR-9的表达异常可改变宫颈癌的侵袭能力,其变化程度可用于预测患者预后^[5]。最新有研究表明,宫颈癌组织中Twist homolog 2 (TWIST2)可上调miR-221-3p,导致血小板反应蛋白2 (THBS2)表达下降,肿瘤组织侵袭能力加强^[12]。VEGF-C作为重要的促肿瘤恶性进展因子,其调控miRNA的作用少见报道,但目前已引发关注。例如最新的研究报道,VEGF-C可通过下调miR-326,上调皮层肌动蛋白结合蛋白cortactin蛋白表达,增强食管癌的侵袭和转移^[13]。与此类似,我们的研究表明,VEGF-C可下调miR-145表达,这为VEGF-C调控microRNA提供了新的靶点。miR-145可通过下调SIP1增强宫颈癌细胞侵袭^[6],与之一致,本研究中转染miR-145类似物,可逆转VEGF-C促SIP1蛋白表达的效应,提示VEGF-C通过调控miR-145影响SIP1的转录后蛋白表达。但是,VEGF-C如何调控miR-145表达,目前尚不清楚,需要我们进一步研究。

综上所述,本研究表明,VEGF-C可能下调miR-145表达,而上调SIP1蛋白表达,增强宫颈癌侵袭能力及促进其恶性进展。进一步对miR-145/SIP1这一途径在宫颈癌中的作用机理开展深入研究,将有助于为宫颈癌的临床治疗提供新的潜在靶点。

参考文献

[1] Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: Follow-up of four European ran-

domised controlled trials [J]. Lancet, 2014, 383 (9916): 524-532.

[2] Park JY, Ngan HY, Park W, et al. Asian society of gynecologic oncology international workshop 2014 [J]. J Gynecol Oncol, 2015, 26(1): 68-74.

- [3] Bayraktar R, Van Roosbroeck K, Calin GA. Cell-to-cell communication: MicroRNAs as hormones [J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(12): 1673-1686.
- [4] Bouyssou JM, Manier S, Huynh D, et al. Regulation of microRNAs in cancer metastasis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1845(2): 255-265.
- [5] Hu X, Schwarz JK, Lewis JS, et al. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4): 1441-1448.
- [6] Sathyanarayanan A, Chandrasekaran KS, Karunakaran D. MicroRNA-145 modulates epithelial-mesenchymal transition and suppresses proliferation, migration and invasion by targeting SIP1 in human cervical cancer cells [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2017, 40(2): 119-131.
- [7] Garland SM, Bhatla N, Ngan HY. Cervical cancer burden and prevention strategies: Asia Oceania perspective [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012, 21(9): 1414-1422.
- [8] Xie XZ, Song K, Cui B, et al. Clinical and pathological factors related to the prognosis of Chinese patients with stage Ib to IIb cervical cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(11): 5505-5510.
- [9] Su JL, Yen CJ, Chen PS, et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression [J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(4): 541-545.
- [10] He M, Cheng Y, Li W, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of RhoA/ROCK-2/moesin cascade [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(1): 170-178.
- [11] Oztas E, Avci ME, Ozcan A, et al. Novel monoclonal antibodies detect Smad-interacting protein 1 (SIP1) in the cytoplasm of human cells from multiple tumor tissue arrays [J]. *Exp Mol Pathol*, 2010, 89(2): 182-189.
- [12] Wei WF, Zhou CF, Wu XG, et al. MicroRNA-221-3p, a TWIST2 target, promotes cervical cancer metastasis by directly targeting THBS2 [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(12): 3220-3233.
- [13] Hong CC, Chen PS, Chiou J, et al. miR326 maturation is crucial for VEGF-C-driven cortactin expression and esophageal cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(21): 6280-6290.

(编辑 余 菁)

(上接第 191 页 from page 191)

- Commun, 2016, 7(6): 11215-11223.
- [21] Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK. Circular RNA and miR-7 in cancer [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(18): 5609-5612.
- [22] Reddy SD, Ohshiro K, Rayala SK, et al. MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(20): 8195-8200.
- [23] Saydam O, Senol O, Wurdinger T, et al. miRNA-7 attenuation in Schwannoma tumors stimulates growth by upregulating three oncogenic signaling pathways [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(3): 852-861.
- [24] Fang Y, Xue JL, Shen Q, et al. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2012, 55(6): 1852-1862.
- [25] Wang K, Liang Q, Wei L, et al. MicroRNA-608 acts as a prognostic marker and inhibits the cell proliferation in hepatocellular carcinoma by macrophage migration inhibitory factor [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3): 3823-3830.
- [26] Wang Z, Xue Y, Wang P, et al. MiR-608 inhibits the migration and invasion of glioma stem cells by targeting macrophage migration inhibitory factor [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(5): 2733-2742.

(编辑 王晓鹰)