

上调 miR-100 降低宫颈癌细胞侵袭和迁移及顺铂耐药性

刘昀昀, 卢淮武, 李 婧, 王东雁, 李睿歆, 周 晖, 林仲秋
(中山大学孙逸仙纪念医院妇科肿瘤, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】在宫颈癌 HeLa、Siha 细胞中上调 miR-100 后,研究细胞侵袭及迁移功能及顺铂耐药性变化并探讨其机制。【方法】将 miR-100 mimic 通过 lipomax 试剂转染至宫颈癌细胞 HeLa、Siha 中,细胞主要分为两组:NC 组,为空白对照;mir100 组,为上调 miR-100 后的细胞。transwell 法观察细胞侵袭性,划痕实验观察迁移性;WB 测定上皮间质变相关蛋白 E-Cadherin、Snail、Vimentin 及 MMP2、uPA 的表达;CCK8 法测定顺铂耐药性。【结果】①两系宫颈癌细胞上调 miR-100 后,细胞的侵袭、迁移性降低;②上调 miR-100 后的宫颈癌细胞中上皮相关分子 E-Cadherin 表达上调,间质表型分子 Snail、Vimentin 表达下调,MMP-2 表达无差异,uPA 表达下降;③不同浓度顺铂作用($P < 0.001$)及是否转染 mir-100 siRNA($P < 0.001$)对细胞存活率的改变均具有显著统计学意义,且浓度因素与处理因素间相对独立;在 Siha 细胞中得出相同结论($P < 0.001$)。HeLaNC、HeLa 100 细胞株顺铂 IC50 ($\mu\text{mol/L}$) 分别为: 8.19 ± 0.34 、 5.38 ± 0.47 , SihaNC、Siha 100 的 IC50 分别为 8.86 ± 0.92 、 6.19 ± 0.23 , $P < 0.05$ 。【结论】miR-100 在宫颈癌细胞 HeLa 及 Siha 中通过降低上皮间质变过程起抑制侵袭和转移的作用,该功能可能与 uPA 的改变有关。上调 miR-100 可降低宫颈癌细胞对顺铂的耐药性。

关键词: miR-100; 宫颈癌, 侵袭性; 顺铂耐药性; 上皮间质变

中图分类号: R737.33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2016)01-0009-06

Up-regulation of miR-100 Attenuates Invasiveness, Migration and Cis-platin Resistance in Cervical Cancer Cells

LIU Yun-yun, LU Huai-wu, LI Jing, WANG Dong-yan, LI Rui-xin, ZHOU Hui, LIN Zhong-qiu
(Department of Gynecological Oncology, Sun Yet-San Memorial Hospital, Guangzhou 510000, China)
Corresponding to: LIN Zhong-qiu, E-mail: 821681761@qq.com

Abstract: 【Objective】 To observe the invasiveness, migration and cis-platin resistance in cervical cancer cell lines HeLa and Siha up-regulated with mir-100 mimics. 【Method】 The expression of mir-100 was up-regulated using mimics via lipomax. Cells were grouped and labeled with 'NC' and 'mir100'. Transwell assay and scarification test were used to reveal the invasiveness and migration of cervical cancer cells, western blot was used to test protein expressions, cck-8 was used to test resistance to cis-platin. 【Result】 With the up-regulation of mir-100, HeLa and Siha lost invasiveness and migration; E-Cadherin increases while snail and vimentin decrease after mir-100 transfection, MMP2 showed no change and uPA was attanuted. HeLa and Siha cells were much more sensitive to cis-platin therapy after up-regulation of mir-100. 【Conclusion】 miR-100 attanuates EMT in cervical cancer cell HeLa and Siha. Up-regulation of miR-100 decreases resistance to cis-platin in HeLa and Siha.

Key words: miR-100; cervical cancer; invasion; platin-resistance; EMT

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(1): 9-14]

随着宫颈癌筛查的普及和宫颈癌疫苗的问世,宫颈癌病死率在一定程度上降低,但是世界范围内,宫颈癌新发病数及死亡数仍占据女性恶性

肿瘤第 4 位,每年全球约有 275 000 死亡病例,占女性恶性肿瘤死亡 7.49%^[1-2],而在发展中国家,宫颈癌占据最常见肿瘤死亡病因第 2 位,据预计,

收稿日期: 2015-07-23

基金项目: 教育部博士点基金(20120171110097); 卫生部临床重点基金(2010439)

作者简介: 刘昀昀, 硕士, 住院医师; 林仲秋, 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: 821681761@qq.com

到 2020 年止,每年将有约 347 100 人死于该病^[3]。宫颈癌常扩散转移到区域淋巴结,且综合治疗后 2 年约 19%~25% 出现淋巴结及盆腔、阴道残端等局部复发转移^[4]。microRNA(以下简称为 miR)为一类短链非编码 RNA,可结合于编码 RNA 的 3' 端非翻译区核苷酸(3' UTR),起到转录因子、基因及蛋白水平的分子调控^[5],在肿瘤的发生发展中占有重要地位^[6]。本实验组前期实验通过临床患者病灶标本的 miR 基因芯片筛选出数个与淋巴结转移有统计学意义的 miRNA,其中 miR-100 差异性表达最高(尚未发表)。miR-100 在乳腺癌^[7]、胃肠道肿瘤^[8]中被发现具有抑癌功能,有学者^[9]研究表明,在宫颈癌中下调 miR-100 可通过 PLK1 蛋白抑制细胞凋亡、促进细胞增殖,提示其可能为宫颈癌抑癌基因。但是 miR-100 在宫颈癌细胞中是否具有抗侵袭、迁移作用尚无文献报道。因此本文旨在观察上调 miR-100 后的宫颈癌细胞侵袭、迁移、顺铂耐药变化情况,并探究其分子机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人宫颈癌细胞株 HeLa、Siha 购自上海生命科学研究院细胞资源中心;MEM 培养基、0.25% 胰酶、胎牛血清购自 Gibco;lipofectamineRNAiMAX 试剂购自 invitrogen 公司;PCR 试剂盒及 miR-100、内参 U6 引物购自 TAKARA 公司,miR-100 引物序列为:5' '-AACCCgTAgATCCgAACTTgTg-3',U6 引物序列为~;miR-100 mimic 及 NC 序列由 Gene Pharm 公司设计并合成,mimic 正链为:5' -AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG-3',反链为:5' -CAAGUUCGGAUCUACGGGUUUU-3',NC 序列为:5' -ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3' 及 5' -UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3';WB 抗体购自 CST 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HeLa 及 Siha 细胞培养在体积分数为 10% 的 FBS 的 MEM 培养基中,置入 37℃ 含体积分数为 5% 的 CO₂ 恒温箱中。细胞培养至 25T 培养瓶底面积 80% 后传代,每日换液。

1.2.2 细胞转染 上述细胞以 30%~50% 密度均匀种于 6 孔板中,每孔 1.8 mL 培养基。取无血清

OPTI-MEM 培养基 100 μL,分别加入 Lipo、NC 序列及 miR-100 mimic 各 3 μL,冰上静置 5 min,再将含有 Lipo 的 OPTI-MEM 加入 NC 或 mimic 溶液中混匀,室温静置 5 min 后均匀滴入 6 孔板中。

1.2.3 RT-PCR 各组细胞于 6 孔板中转染后 24 h,有机溶剂法提取总 RNA,逆转录后将 2 μL cDNA,荧光染料,引物及无酶水按照说明书上比例混匀、加入 PCR 反应板中,置于 BIO-RAD CFX96 Real-Time PCR 仪中,U6 为内参。结果采用 2^{-ΔΔCT} 值计算转染效率。

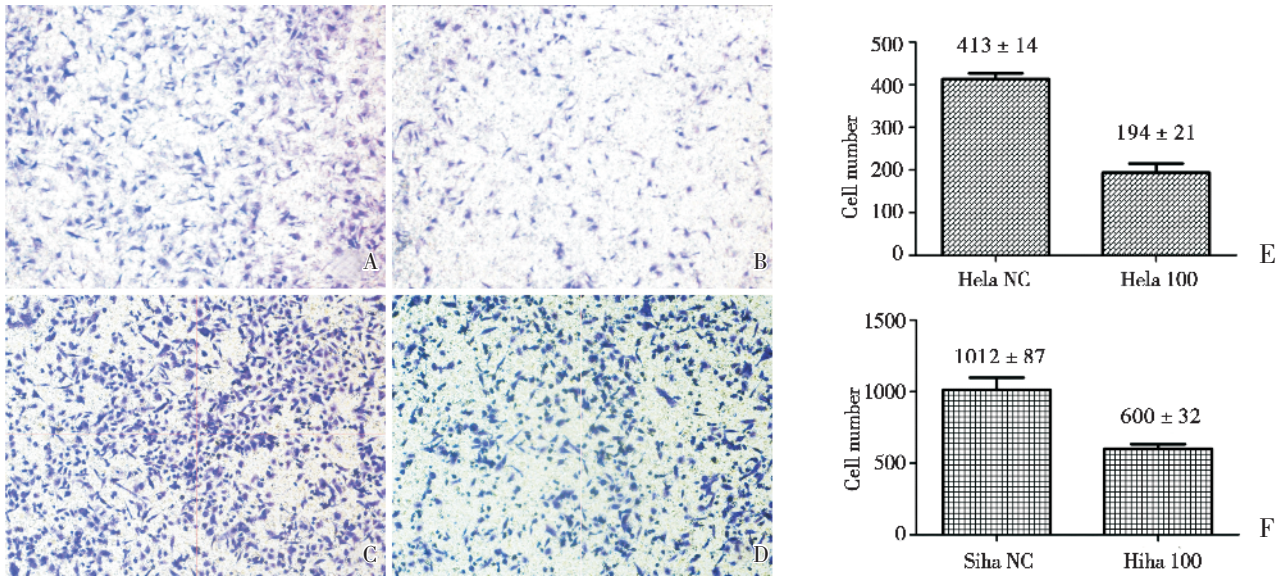
1.2.4 Western Blot 细胞种于中皿,RIPA 裂解提取总蛋白,12% 分离胶(Snail)或 8% 分离胶(E-Cadherin、Vimentin、MMP2) 及 5% 浓缩胶电泳,SDS-PAGE 膜 250mA 恒电流转 90 min,5% TBST 牛奶室温封闭 1 h,一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜后置于羊抗兔二抗室温孵育 1h,再次洗膜后,ECL 发光,Gene Sys 软件自动曝光,以 GAPDH 为内参。

1.2.5 侵袭及划痕实验 10% 基质胶 100 μL 铺于 transwell 上室,37℃ 孵育 4 h 后置入转染了 mimic 或 NC 序列的细胞 5×10⁵/室,上室培养基含血清 1%,下室培养基含血清 10%。24 h 后清洗上室,将上室底层用 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 15 min,4% 结晶紫染色 15 min 后高倍镜下观察拍照,每个小室取任意 5 个视野拍照,计数后计算平均值,重复 3 次后行统计学分析。转染 mimics 或 NC 的细胞置入 24 孔板中,贴壁后在孔中过直径划线,48 h 后 20× 物镜下观察。

1.2.6 顺铂耐药实验 分别将 3 组细胞以 10⁴ 个/孔的密度种于 96 孔板,贴壁后将培养基更换为 6 个不同浓度(0、2.5、5、10、20、40 μmol/L)含顺铂培养基,48 h 后加 10% 的 CCK8 避光孵育 2 h;酶标仪测量 450 nm 处吸光度(A),抑制率 R_s = A_{某药物浓度}/A_{对照组} × 100%。每组设 5 个复孔及无培养基对照孔,重复 3 次。

1.3 统计与绘图

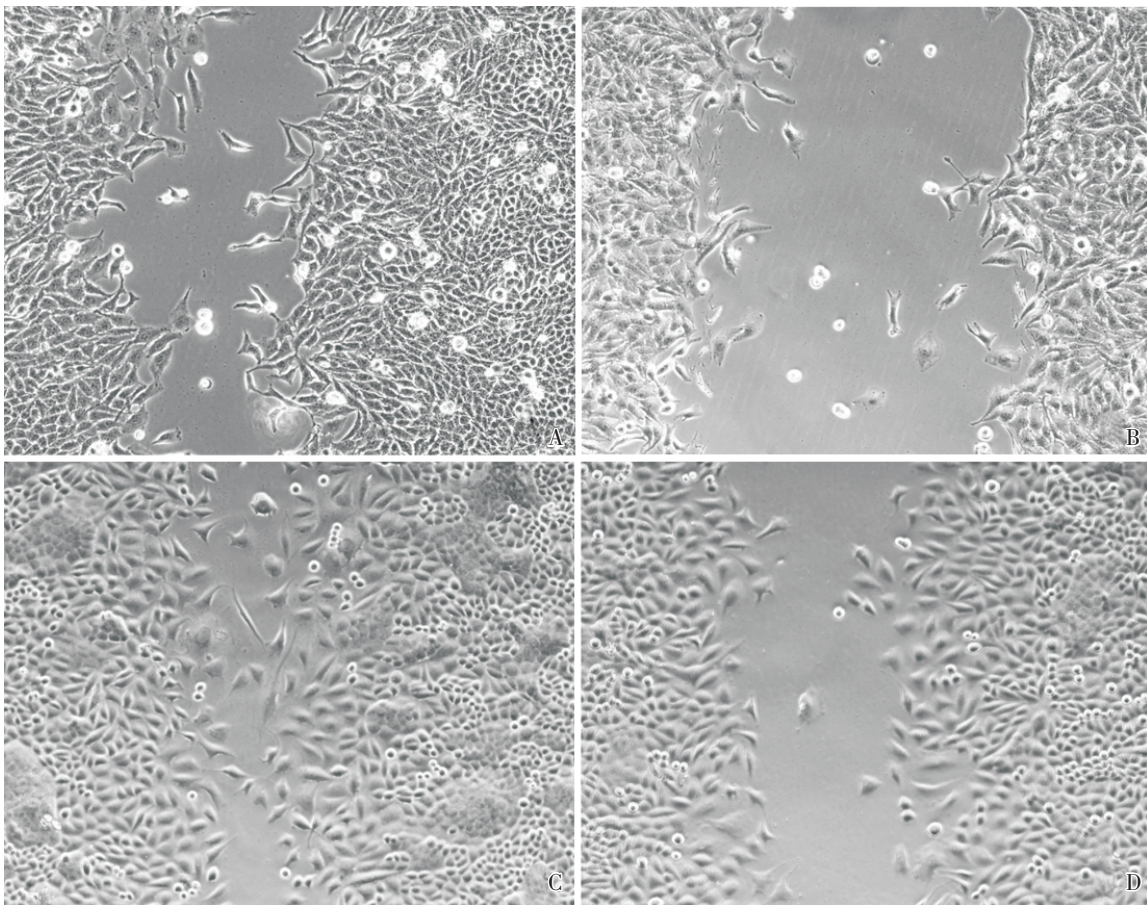
SPSS13.0 软件处理数据,数据采用方差齐性检验,若方差齐则样本符合正态分布的总体,两样本间差异采用 t 检验,P < 0.05 为差异有统计学意义;细胞对顺铂的 IC₅₀ 值使用 prohibit 回归,以 10 为底数计算;抑制率数据由于涉及两个因素处理,采用随机区组设计方差分析;Graphpad Prism 5.0 及 PS CS3 软件进行绘图。



A: HeLa NC; B: HeLa 100; C: Siha NC; D: Siha 100; 200x. E: statistics of HeLa ($P < 0.001$); F: statistics of Siha ($P < 0.001$).

图 1 transwell 法检测细胞侵袭性结果

Fig.1 Invasiveness of cervical cancer transfected with miR-100 mimics and NC sequences using transwell assay



A: HeLa NC; B: HeLa 100; C: Siha NC; D: Siha 100. ×40

图 2 划痕实验

Fig.2 Wound healing assay of cervical cancer transfected with miR-100 mimics and NC sequences

2 结 果

2.1 转染效率

转染 miR-100 mimics 及 NC 序列后 24 h 提取 RNA, 逆转录为 cDNA 行 PCR, 计算各组 miR-100 表达差异情况并行统计学分析, 将转染 mimics 的细胞分别命名为 HeLa 100 及 Siha 100, 转染 NC 序列者命名为 HeLa NC 及 Siha NC. 计算得: HeLa 100 及 Siha 100 细胞中 miR-100 的表达量较 NC 组分别为 (437.0 ± 9.5) 倍及 (683.0 ± 6.2) 倍, $P < 0.001$.

2.2 侵袭及划痕实验

侵袭实验通过基质胶及 transwell 小室模拟体内环境, 从而反映细胞侵袭能力, 如图 1 所见, 转染 miR-100 mimics 序列后的两组细胞侵袭能力较转染 NC 序列者弱, 差异有显著统计学意义。划痕实验则在一定程度上模拟了细胞迁移能力, 实验证明在宫颈癌 HeLa、Siha 中上调 miR-100 后, 宫颈癌细胞迁移能力也下降(图 2)。

2.3 Western Blot

实验发现, 上调 miR-100 后的宫颈癌细胞 E-cadherin 表达增强, 而 Vimintin 及 Snail 蛋白表达下调(图 3), 表明高表达 miR-100 的宫颈癌细胞表型更趋向于上皮型细胞, 其发生 EMT 的倾向较 NC 组明显减少, 然而 miR-100 上调后, 细胞表达 MMP-2 水平并无差异, uPA 表达下降。

2.4 耐药实验

方差分析表明: 在 HeLa 细胞中, 不同浓度顺

铂作用 ($F = 248.08, P < 0.001$) 及是否转染 miR-100 siRNA ($F = 26.39, P < 0.001$) 对细胞存活率的改变均具有显著统计学意义, 且浓度因素与处理因素间相对独立; 在 Siha 细胞中得出相同结论 (F 浓度 = 263.22; $P < 0.001$; F 处理 = 32.17, $P < 0.001$)。HeLa NC、HeLa 100 细胞株顺铂 IC₅₀ 分别为 (8.19 ± 0.34) 、 (5.38 ± 0.47) $\mu\text{mol/L}$, SihaNC、Siha 100 用顺铂处理后的 IC₅₀ 分别为 (8.86 ± 0.92) 、 (6.19 ± 0.23) $\mu\text{mol/L}$ 。对于 HeLa 细胞, 两组在顺铂浓度 2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 时差异有明显统计学意义,

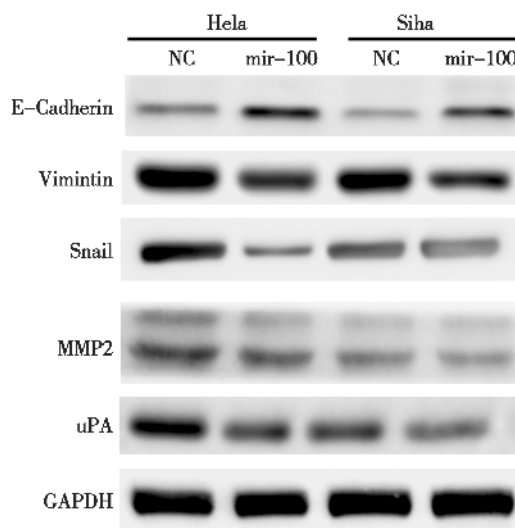


图 3 宫颈癌细胞中上调 miR-100 后 EMT 相关蛋白表达情况

Fig.3 Expressions of EMT associated proteins after up-regulating miR-100 in HeLa and Siha cells

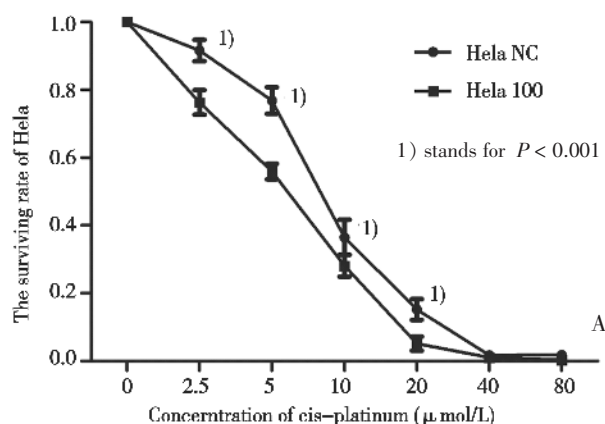
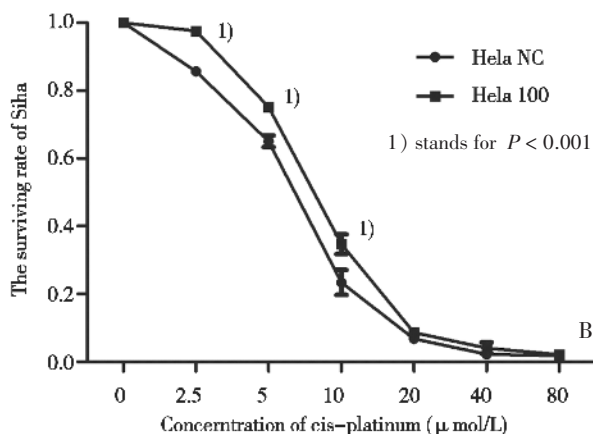


图 4 转染 miR-100 及 NC 序列后的宫颈癌细胞在不同浓度顺铂作用下存活曲线

Fig.4 The survival rates of cervical cancer cells transfected miR-100 mimic and NC sequences under different cis-platinum concentrations



Siha 100 及 Siha NC 组在药物浓度为 2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 时具有统计学差异(图 4)。

3 讨 论

宫颈癌为发展中国家女性常见恶性肿瘤之一,目前有年轻化趋势,肿瘤主要为浸润性生长,常伴发盆腔淋巴结转移,一旦发生转移或复发,其病死率骤升,对于含有多个高危因素或者综合治疗后复发患者,含铂药物化疗具有重要意义,然而耐化疗宫颈癌的存在导致了治疗失败。近年来,miRNA 被多项研究证实在肿瘤的发生、发展、化疗抵抗中^[10]起重要作用,有学者^[9]发现 miR-100 可促进肿瘤凋亡、抑制生长,起到抑癌作用,然而其与侵袭、迁移及耐药的关系尚无报道。本实验证实,在宫颈癌细胞中上调 miR-100 抑制了上皮间质转化过程(下称 EMT),降低细胞侵袭、迁移性,同时起到顺铂增敏作用。

研究证实,肿瘤细胞发生 EMT 后,胞间连接蛋白及上皮样标志分子 E-Cadherin 分泌减少,细胞形变并逐渐脱离表皮间束缚,表达间质样细胞标志分子如 Snail、Vimentin 并分泌基质金属蛋白酶 MMP 溶解上皮基质,从而获得强侵袭、迁移性^[11-12]。此外,uPA 分子因具有控制细胞骨架降解、降低细胞黏附功能及解体细胞外基质的作用,在肿瘤细胞的侵袭、迁移中占据重要地位,从而调控 EMT 的发生发展。EMT 的发生受到包括转录因子、细胞外受体和 miRNA 等在内多种因素调控^[13]。根据 miRNA 靶基因数据库及相关文献验证,miR-100 较可靠地下游靶基因包括 AGO2、mTOR 等,其中 miR-100 在肝癌中可直接结合于 AGO2 的 3'UTR 端,调控其表达,表达降低后的 AGO2 调控其下游靶基因 Snail1 和 ZEB1。对宫颈癌细胞的 miRNA 家族与常见细胞通路研究发现,miR-100 可通过结合 mTOR-PI3K 通路起到抑制侵袭、迁徙的功能。

上述研究表明,在宫颈癌细胞中上调 miR-100 可通过若干通路抑制 EMT 降低肿瘤侵袭、迁移性,同时在上调了 miR-100 的细胞中 uPA 下降,而传统的 MMP2 没有变化;与此相反,有研究者^[14]发现 miR-100 在乳腺癌中既可促进凋亡、抑制肿瘤侵袭、转移,又能诱导 EMT 的发生,这一矛盾现象源于 miR-100 在乳腺癌细胞中通过两个独立通路起作用,一方面它通过抑制下游 HOXA1 基因起

到减少转移、侵袭的效果,一方面通过抑制下游 SMARCA5,降低 E-Cadherin 表达促进 EMT 发生。综上所述,miR-100 作用机制在不同肿瘤中不尽相同甚至相反,这可能由不同肿瘤基因差异性表达造成。miR-100 在宫颈癌中抑制 EMT 的机制尚不清楚,但本研究证实,其在宫颈癌中具有抑癌作用,可能为分子治疗靶点之一。

另外,我们观察到上调 miR-100 后,宫颈癌细胞对顺铂敏感性增强,但是目前并无 miR-100 可直接作用于耐药蛋白的相关文献。因此我们推测 miR-100 可能通过以下方式增强宫颈癌细胞化疗敏感性:①通过抑制 EMT 介导:Rosano 在研究耐化疗卵巢癌细胞时发现,其化疗耐受性与 EMT 的发生密切相关,在卵巢癌细胞中加入上皮形成素阻断 EMT 逆转了卵巢癌细胞对顺铂耐药性^[15]。综上所述,抑制 EMT 可降低细胞对化疗的敏感性。有学者认为,具有 EMT 倾向的肿瘤细胞被认为是一种“干细胞类似(Stem Cell-Like)”细胞^[16],当其发生 EMT 后,即意味向干细胞转化,而耐药正是肿瘤干细胞(CSC)重要特性之一,然而目前对于 CSC 是否真实存在尚有争议,在宫颈癌中更无公认干细胞标志分子;②通过阻断下游基因表达:查阅 TargetScan、MiRanda、Pictor、DianaLab 等基因库综合分析并查阅文献后发现,miR-100 较可靠的下游基因有 mTOR、AGO2、ATM、IGFIR、PI3K、HOMOX 等。前者被证实软骨肉瘤中为 miR-100 介导顺铂增敏的分子基础^[17],而后者是 DNA 双链损伤修复的核心分子^[18],可通过感知 DNA 损伤、招募修复蛋白、促进细胞周期停滞等机制减少化学刺激对肿瘤细胞促凋亡的作用^[19-20]。因此,miR-100 可分别结合于 mTOR 及 ATM 的 3'端非翻译区核苷酸(3'UTR),从基因水平阻断其表达,从而起到顺铂增敏作用。

结合上述文献证据及研究结果,我们证实 miR-100 为宫颈癌抑癌基因之一,基于其顺铂增敏作用及抑制侵袭、迁移能力,它或许会成为未来宫颈癌基因干扰治疗的靶点之一。

参考文献

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer Clin, 2012, 61 (2): 69-90.
- [2] DESANTIS CE, LIN CC, MARIOTTO AB, et al.

- Cancer treatment and survivorship statistics [J]. *CA Cancer Clin*, 2014, 64(4):252-271.
- [3] AKHTAR -DANESH N, ELIT L, LYTWYN A. Temporal trends in the relative survival among women with cervical cancer in Canada: a population based study [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2012, 22(7):1208-1213.
- [4] KAMER S, REN Q, DICKER AP. Differential radiation sensitization of human cervical cancer cell lines by the proteasome inhibitor velcade (bortezomib, PS-341) [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2009, 279(1):41-46.
- [5] CHEN CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. *N Engl J Med*, 2005, 35(3):1768-1771.
- [6] KENT OA, MENDELL JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes [J]. *Oncogene*, 2006, 25(46):6188-6196.
- [7] GEBESHUBER CA, MARTINEZ J. miR -100 suppresses IGF2 and inhibits breast tumorigenesis by interfering with proliferation and survival signaling [J]. *Oncogene*, 2013, 32(27):3306-3310.
- [8] NG WL, DAN Y, ZHANG XM, et al. Over expression of miR-100 is responsible for the low expression of ATM in the human glioma cell line: M059J [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2010, 9(11):1170-1175.
- [9] BAO HL, JIAN SZ, FENG YE, et al. Reduced miR-100 expression in cervical cancer and precursors and carcinogenic effect through targeting PLK1 protein [J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(9):2166-2174.
- [10] DAI Y, XIE CH, NEIS JP, et al. MicroRNA expression profiles of head and neck squamous cell carcinoma with docetaxel-induced multidrug resistance [J]. *Head Neck*, 2011, 33(6):786-791.
- [11] MESSERE AE, FABBRI M, BORGATTI M, et al. Antiproliferative activity of Pt(II) and Pd(II) phosphine complexes with thymine and thymidine [J]. *InorgBiochem*, 2007, 101(2): 254-260.
- [12] KONG D, LI Y, WANG Z, et al. Cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition(EMT)-phenotypic cells: are they cousins or twins? [J]. *Cancer(Basel)*, 2011, 23(3):716-729.
- [13] ZHANG J, MA L. MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2012, 31(9): 653-662.
- [14] CHEN D, SUN Y, YUAN Y, et al. miR-100 induces epithelial-mesenchymal transition but suppresses tumorigenesis, migration and invasion [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(2):1-14.
- [15] ROSANO L, CIANFROCCA R, SPINELLA F, et al. Acquisition of chemoresistance and EMT phenotype is linked with activation of the endothelin A receptor pathway in ovarian carcinoma cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(8):2350-2360.
- [16] MANI SA, GUO W, LIAO MJ, et al. The epithelial mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. *Cell*, 2008, 133(9): 704-715.
- [17] ZHU Z, WANG CP, ZHANG YF, et al. MicroRNA-100 resensitizes resistant chondrosarcoma cells to cisplatin through direct targeting of Mtor [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(2):917-923.
- [18] BRUNO T, DE NICOLA F, S. IEZZI S, et al. Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint [J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(6):473-486.
- [19] LAVIN MF, KOZLOV S. ATM activation and DNA damage response [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(8):931-942.
- [20] LIANG N, JIA L, LIANG B, et al. ATM pathway is essential for ionizing radiation-induced autophagy [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(12):2530-2539.

(编辑 徐杰)