

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.05.004

MiR-144-3p 抑制 NFE2L2 的表达降低宫颈癌细胞的增殖和迁移*

王志景,马丽丽,王慧,程珂,何全中[△],孙力
(新乡医学院第三附属医院妇产科,河南新乡 453003)

[摘要] **目的** 研究 miR-144-3P 对宫颈癌细胞增殖和迁移的影响,并初步探讨其作用机制。**方法** 通过瞬时转染 miR-144-3p mimics(mimics 组)、inhibitors(inhibitors 组)和阴性对照(NC 组)到宫颈癌 Hela 细胞中,以未干预 Hela 细胞为正常对照,CCK-8 检测细胞增殖活性,Transwell 检测细胞迁移能力,实时定量 PCR 和 Western Blot 检测细胞中 NFE2L2 的表达水平。**结果** CCK-8 结果显示,转染 48 h 后 mimics 组、inhibitors 组和 NC 组的增殖率分别为(83.3±2.0)%、(113.1±0.8)%和(100.2±0.2)%,差异有统计学意义($P<0.05$);transwell 小室的细胞数目分别为(78.3±3.5)、(109.3±4.2)和(96.0±4.0)个,差异有统计学意义($P<0.05$);实时定量 PCR 结果显示 mimics 组、inhibitors 组和 NC 组 NFE2L2 的表达量分别为 0.40±0.01、1.94±0.04 和 1.00±0.03,差异有统计学意义($P<0.05$);Western Blot 显示各组 NFE2L2 的表达量差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 体外实验证实 miR-144-3p 能够抑制宫颈癌细胞的增殖和浸润,可能和抑制 NFE2L2 的表达有关。

[关键词] 宫颈癌;miR-144-3p;NFE2L2;Hela 细胞

[中图分类号] R737.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)05-0738-04

MiR-144-3p reduces proliferation and migration of cervical cancer cells by restraining expression of NFE2L2*

WANG Zhijing, MA Lili, WANG Hui, CHENG Ke, HE Quanzhong[△], SUN Li

(Department of Gynecology and Obstetrics, Third Affiliated Hospital, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of miR-144-3P on the proliferation and migration of cervical cancer cells and to preliminarily explore its action mechanisms. **Methods** The miR-144-3p mimics(mimics group),inhibitors(inhibitors group) and negative control (NC group) were transiently transfected into cervical cancer Hela cells. The non-intervention Hela cells served as the normal control. The proliferation activity of cervical cancer cells was detected by CCK-8 and the migration ability was detected by Transwell assay. The real-time PCR and Western Blot were used to detect the expression level of NFE2L2 in Hela cells. **Results** The CCK-8 results showed that the proliferation rates after 48 h of transfection in the mimics group, inhibitor group and NC group were(83.3±2.0)%,(113.1±0.8)% and(100.2±0.2)% respectively;and the difference was statistically significant($P<0.05$);the numbers of cells in Transwell lower chamber were(78.3±3.5), (109.3±4.2)and(96.0±4.0)respectively,and the difference was statistically significant;the real-time PCR results showed that the expression levels of NFE2L2 of mimics group,inhibitors group and NC group were 0.40±0.01,1.94±0.04 and 1.00±0.03 respectively,and the difference was statistically significant;Western blot results showed that the expression levels of NFE2L2 had statistically significant difference among various groups. **Conclusion** The in vitro experiments confirm that miR-144-3p can inhibit the proliferation and infiltration of cervical cancer cells,which may be related to the inhibition of NFE2L2 expression.

[Key words] cervical cancer;miR-144-3p;NFE2L2;Hela cells

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤,严重影响我国妇女的健康。在我国,宫颈癌的发生率为 98.9/100 000,病死率达到 30.5/100 000,而且有逐渐年轻化的趋势^[1]。宫颈癌的发生原因相对明确,即 HPV 病毒的

反复感染。但是宫颈癌发生和转移的机制相对复杂,目前尚未完全阐明。笔者前期的研究发现,miR-144-3p 在宫颈癌组织中的表达降低,本研究在体外进一步验证 miR-144-3p 对宫颈癌细胞株的作用,现将结果

* 基金项目:河南省新乡市科技局资助项目(ZG15016)。 作者简介:王志景(1982—),主治医师,本科,主要从事妇科肿瘤研究工作。

[△] 通信作者,E-mail:sfyfck@163.com。

报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 胎牛血清和 RPMI 1640 细胞培养基购自美国 Hyclone 公司,青-链霉素双抗、考马斯亮蓝、凝胶试剂盒、硝酸纤维素膜、ECL 发光试剂盒、兔抗人一抗和羊抗兔二抗购自博士德生物工程有限公司,CCK-8 试剂盒、反转录试剂盒均购自碧云天生物工程有限公司,实时定量 PCR 试剂盒购自天根生物工程有限公司,倒置相差显微镜及荧光显微镜均购自日本 Nikon 公司。

1.2 细胞培养 宫颈癌 HeLa 细胞购自中国科学院上海细胞库。用含 10% 胎牛血清,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素及 0.1 mg/mL 链霉素的 PRMI1640 培养基培养,并置于含 5% CO_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中。每 2~3 天换液 1 次。倒置相差显微镜观察细胞生长情况,铺满 80% 左右时,用 0.25% 胰酶(含 0.02% EDTA)进行消化,按 1:3 比例进行传代。细胞对数生长期内进行实验。

1.3 细胞转染 细胞生长约 80% 时进行转染。将 miR-144-3p mimics (mimics 组)、inhibitors (inhibitors 组)和阴性对照(NC 组)(仅使用 Lipofectamine 2000)转染细胞,以未进行干预的 HeLa 细胞为正常对照组(HeLa 组),操作步骤按照说明书进行,每组设 3 个复孔。

1.4 CCK-8 检测细胞增殖活性 细胞转染 48 h 后,消化离心,按每孔约 2×10^3 个细胞的浓度接种于 96 孔板中,每组设 3 个复孔。培养过夜吸弃培养基,用不含血清的 DMEM 培养基漂洗 2 遍,每孔加入 CCK-8 染色液 100 μL ,37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育染色 1 h,用酶联免疫标记仪测定细胞的吸光值(A_{450}),计算出细胞的增殖率(以 NC 组为 100% 计算)。

1.5 Transwell 检测细胞迁移能力 细胞转染 48 h 后,分别将 3 组细胞制成约 $10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液(培养基不含胎牛血清),取 200 μL 接种于上层小室内,下层小室内加入 300 μL 含 10% 胎牛血清的培养基作为化学诱导物,每组设 3 个复孔。37 $^\circ\text{C}$ 培养 24 h 后,取出下层小室,吸干培养基,加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤 3 次,Gemisa 溶液染色 5 min,在高倍镜下($\times 400$)选取 5 个视野计数细胞,取平均数作为实验结果。以对照组为 100%,计算各组细胞的迁移率。

1.6 实时定量 PCR 检测 NFE2L2 mRNA 的变化 转染后取对数生长期的细胞,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,按说明书进行操作。分光光度计测定 RNA 浓度后,取 1 μg RNA 反转录为 cDNA,操作过程按反转录试剂盒说明书进行。引物序列:NFE2L2 上游引物为 5'-ACACGGTCCACAGCTCATC-3',下游引物为 5'-TGTC AATCAAATCCATGTCCTG-3'; GADPH 内参 正义链 5'-CTTCATTGACCTCAACTAC-

3',反义链 5'-GCCATCCACAGTCTTCTG-3'。采用 25 μL 反应体系,按说明书进行。PCR 反应条件:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^\circ\text{C}$ 变性 10 s,60 $^\circ\text{C}$ 退火延伸 30 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

1.7 蛋白提取和 Western Blot 检测 NFE2L2 水平 转染后取对数生长期的细胞以 $10^6/\text{mL}$ 的密度种植于 6 孔板中培养过夜。4 $^\circ\text{C}$ PBS 漂洗 3 次;0.25% 胰酶消化并收集细胞(漂洗液离心后收集细胞),加入 200 μL RIPA 裂解液(含体积分数为 1% 的 PMSF)置于冰上裂解 30 min。4 $^\circ\text{C}$ 12 000 r/min 离心 15 min(低温离心机提前 30 min 启动并预冷),收集上清液,考马斯亮蓝法测蛋白浓度。用 RIPA 裂解液调整样品蛋白浓度至相同水平,热变性蛋白。取相同总量的蛋白质进行凝胶电泳,转膜,孵育一抗(1:1 000 稀释)4 $^\circ\text{C}$ 过夜。加入二抗(1:2 000 稀释),室温孵育 2 h,TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。在暗室内使用 ECL 发光液发光,压片后曝光盒曝光。图片照相后用 Quantity-One 分析软件进行分析测定。

1.8 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件对数据进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 ANOVA 方差分析,计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 结果显示 miR-144-3P 抑制 HeLa 细胞的增殖 转染 48 h 后,mimics 组细胞的增殖活性为 $(83.2 \pm 2.0)\%$;而 inhibitors 组细胞的增殖活性为 $(113.0 \pm 0.8)\%$,与 NC 组 $(100.2 \pm 0.2)\%$ 相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。而 NC 组和 HeLa 组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

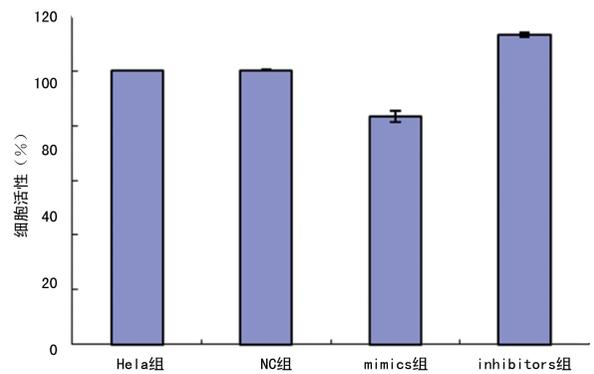


图 1 转染后各组细胞的增殖活性情况

2.2 miR-144-3p 抑制 HeLa 细胞的迁移能力 转染 48 h 后,mimics 组 HeLa 细胞迁移到下层数目为 (78.3 ± 3.5) 个,而 inhibitors 组数目为 (109.3 ± 4.2) 个,和 NC 组 (96.0 ± 4.0) 个相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 NC 组和 HeLa 组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2。

2.3 miR-144-3p 抑制 HeLa 细胞 NFE2L2 的表达 实时定量 PCR 结果发现,以正常 HeLa 细胞为参照,

NC 组、mimics 组和 inhibitors 组中 NFE2L2 的相对表达量分别为 1.00 ± 0.03 、 0.40 ± 0.01 、 1.94 ± 0.04 ，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见图 3。而 Western Blot 结果显示，mimics 组中 NFE2L2 的蛋白表达量明显降低，inhibitors 组的表达量显著升高，和 NC 组 (1.00 ± 0.03) 相比，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，而 NC 组和 Hela 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图 4。

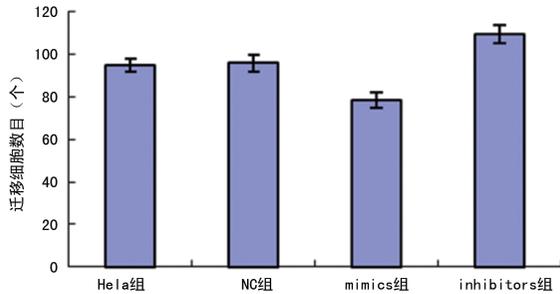


图 2 转染后各组细胞迁移细胞数目情况

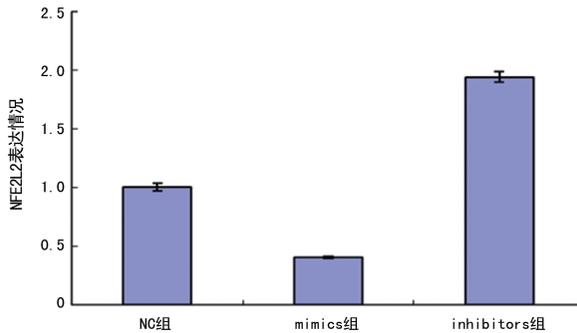


图 3 转染后各组 NFE2L2 的表达情况

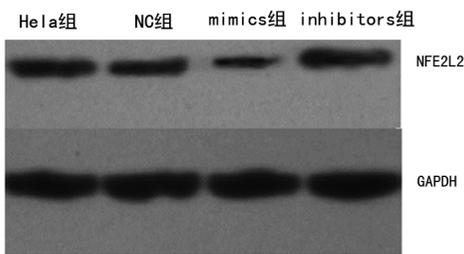


图 4 Western Blot 结果显示各组 NFE2L2 的表达情况

3 讨 论

MiRNAs 是 1993 年在线虫中被发现的^[2]。目前，医学界已经发现它在多种物种中均有表达，而且在心血管、感染、自身免疫性疾病和代谢障碍等方面发挥重要的调节作用^[3-4]。研究表明，miRNAs 在肿瘤的发生、发展中起重要的调节作用，可以作为癌基因或抑癌基因调节肿瘤的增生、浸润和转移等过程^[5]，有些 miRNA 有成为是肿瘤诊断标志物的潜力^[6]。

miR-144-3p 是 miR-144 的成熟体，在多种生理和病理过程中有发挥重要的调节作用。在创伤后的恐惧消退实验中发现，miR-144-3p 集中表达在杏仁核附

近，并促进恐惧消退的恢复，说明在中枢神经受损后 miR-144-3p 能够促进其恢复^[7]。过表达的 miR-144-3p 能够抑制骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化，通过荧光素酶报道实验和 Western Blot 结果显示，其能够通过抑制 Smad4 发挥作用^[8]。在帕金森的发病过程中，过表达的 miR-144-3p 能够抑制 β -前淀粉样蛋白，上调线粒体功能相关的重要基因如过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)、核呼吸因子 1 (NRF-1) 和线粒体转运因子 A (TFAM) 的表达，并且增加细胞内三磷酸腺苷 (ATP) 和细胞活性，而 β -前淀粉样蛋白表达增多则起到相反的作用^[9]，说明 miR-144-3p 在帕金森病的发生过程中发挥重要的作用。

在肿瘤的发生和发展过程中，miR-144-3p 也发挥重要的作用。在一项肝癌细胞的研究中发现，和癌旁组织相比，miR-144-3p 表达明显下降，而且和患者的手术和预后存在相关性；通过生物学分析发现，其调节多种细胞功能和多条肝癌细胞相关的病理通路，包括 P53 通路^[10]。在喉鳞状细胞癌的体外研究中发现，miR-144-3p 能够特异性地作用于 E26 特异转录因子 1 (ETS-1)，部分通过抑制上皮-间质的转化从而抑制细胞的增殖、浸润和转移^[11]。在多发性骨髓瘤患者的血浆及细胞系中，miR-144-3p 的表达均明显降低，而体外过表达 miR-144-3p 能够明显地抑制细胞的增殖和集落形成，促进细胞周期的停滞和凋亡；进一步检测发现其是通过抑制 c-MET 的表达，从而调控 PI3K/AKT 通路来发挥作用的^[12]。在这些肿瘤中，miR-144-3p 均发挥抑癌基因的作用。在急性髓系白血病的研究报告中发现，miR-144-3p 在骨髓和外周血中的表达均明显升高，而且在细胞系 HL-60 中表达也明显增高，通过双荧光素酶报道实验发现其靶基因为 NRF2。抑制 miR-144-3p 的表达后，NRF2 能够降低细胞的活性并促进细胞的凋亡^[13]。说明在急性髓系白血病中，miR-144-3p 发挥抑癌基因的作用。而在肾透明细胞癌中的研究也发现，miR-144-3p 能够促进细胞的增殖、浸润和耐药性的形成，发挥抑癌基因的作用^[14]。这些研究说明，miR-144-3p 在不同的肿瘤中发挥抑癌基因或癌基因的作用。笔者之前的研究发现，在宫颈癌中 miR-144-3p 的表达明显降低，而且和患者的临床特征相关，推测其可能发挥抑癌基因的作用。笔者通过体外研究进一步发现 miR-144-3p 能够抑制细胞的增殖和浸润。

NFE2L2 是细胞内抗氧化应激的主要转录因子，在生理及病理过程中发挥重要的调节作用^[15]。匈牙利的一项儿童哮喘的病例对照研究发现，NFE2L2 的基因多态性和环境污染后感染引起的哮喘有相关性^[16]。而 NFE2L2 的突变，会导致体内氧化-还原系

统失衡,在多种肿瘤的发生和发展中发挥重要的作用。在结肠癌细胞系中研究发现,抑制 NFE2L2 的表达会导致 miR-181c 的激活,抑制线粒体的电子传递链的重要单位细胞色素 C 的氧化酶,从而抑制细胞内 ATP 的生成^[17]。在恶性黑色素瘤中的标本免疫组织化学研究中发现,和原发灶相比,在转移灶中 NFE2L2 的表达更高而 KEAP1 的表达降低,而且细胞核中 NFE2L2 的表达和远处转移及 TWIST 蛋白的表达相关,而且 NFE2L2 和 TWIST 蛋白均表达和患者的预后差明显相关,说明 NFE2L2 在恶性黑色素瘤的转移和上皮-间质转化中可能发挥重要的作用^[18]。而在维吾尔族妇女宫颈鳞癌中的研究发现,和宫颈上皮内瘤变及正常宫颈组织相比,NFE2L2 的表达升高;宫颈癌细胞系中的研究发现,抑制 NFE2L2 表达能明显地抑制肿瘤细胞的增殖和浸润^[19]。说明 NFE2L2 在宫颈癌的发生、发展中发挥重要的作用。笔者前期的研究结果证实,NFE2L2 在宫颈癌中的表达是升高的;在本研究中,抑制 NFE2L2 的表达能够降低宫颈癌细胞的增殖和浸润。

综上所述,本研究在细胞系中验证了 miR-144-3p 在宫颈癌细胞中的作用,并进一步验证其靶基因可能是 NFE2L2。但是本研究仍存缺陷,没有采用双荧光素酶法进行直接观察。本研究观察到 miR-144-3p 在宫颈癌的作用,但是其具体的调控成熟及其发挥作用的途径尚需要进一步的研究。

参考文献

- [1] CHEN W,ZHENG R,BAADE P D,et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] LEE R,FEINBAUM R,AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. Cell,1993,75(5):843-854.
- [3] KAYA K,KARAKULAH G,YAKICIER C,et al. mESAdb: microRNA expression and sequence analysis database[J]. Nucleic Acids Res,2011,39(1):170-180.
- [4] WINTER J,JUNG S,KELLER S,et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation[J]. Nat Cell Biol,2009,11(3):228-234.
- [5] BOURDON J A,SABER A T,HALAPPANAVAR S,et al. Carbon black nanoparticle intratracheal installation results in large and sustained changes in the expression of miR-135b in mouse lung[J]. Environ Mol Mutagen,2012, 53(6):462-468.
- [6] LOU N,RUAN A M,QIU B,et al. miR-144-3p as a novel plasma diagnostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma[J]. Urol Oncol,2017,35(1):e7-e14.
- [7] MURPHY C P,LI X,MAURER V,et al. MicroRNA-mediated rescue of fear extinction memory by miR-144-3p in extinction-impaired mice [J]. Biol Psychiatry, 2017, 81(12):979-989.
- [8] HUANG C,GENG J,WEI X,et al. MiR-144-3p regulates osteogenic differentiation and proliferation of murine mesenchymal stem cells by specifically targeting Smad4[J]. FEBS Lett,2016,590(6):795-807.
- [9] LI K,ZHANG J,JI C,et al. MiR-144-3p and its target gene beta-amyloid precursor protein regulate 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mitochondrial dysfunction[J]. Mol Cells,2016,39(7):543-549.
- [10] LIANG H W,YE Z H,YIN S Y,et al. A comprehensive insight into the clinicopathologic significance of miR-144-3p in hepatocellular carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2017,10(11):3405-3419.
- [11] ZHANG S Y,LU Z M,LIN Y F,et al. miR-144-3p, a tumor suppressive microRNA targeting ETS-1 in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Oncotarget, 2016, 7(10):11637-11650.
- [12] ZHAO Y,XIE Z,LIN J,et al. MiR-144-3p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in multiple myeloma by targeting c-Met[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(5): 2437-2446.
- [13] SUN X,LIU D,XUE Y,et al. Enforced miR-144-3p expression as a non-invasive biomarker for the acute myeloid leukemia patients mainly by targeting NRF2[J]. Clin Lab,2017,63(4):679-687.
- [14] XIAO W,LOU N,RUAN H,et al. Mir-144-3p promotes cell proliferation, metastasis, sunitinib resistance in clear cell renal cell carcinoma by downregulating ARID1A[J]. Cell Physiol Biochem,2017,43(6):2420-2433.
- [15] MERRY T L,RISTOW M. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2,Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice[J]. J Physiol,2016,594(18):5195-207.
- [16] UNGVARI I,HADADI E,VIRAG V,et al. Relationship between air pollution, NFE2L2 gene polymorphisms and childhood asthma in a Hungarian population[J]. J Community Genet,2012,3(1):25-33.
- [17] JUNG K A,LEE S,KWAK M K. NFE2L2/NRF2 activity is linked to mitochondria and AMP-activated protein kinase signaling in cancers through miR-181c/mitochondria-encoded cytochrome C oxidase regulation[J]. Antioxid Redox Signal,2017,27(13):945-961.
- [18] EMILY D C,JINAH K. An immunohistochemical study of NFE2L2, KEAP1 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and the EMT markers SNAI2,ZEB1 and TWIST1 in metastatic melanoma[J]. Histol Histopathol, 2017, 32(2): 129-136.
- [19] 焦淑娟,郑士奇,王世雯,等. Nrf2 蛋白在维吾尔族妇女宫颈鳞癌中的表达及意义[J]. 新疆医科大学学报,2016, 39(4):411-417.