

• 论 著 •

miR-92a 靶向 PTEN 促进宫颈癌细胞增殖*

蒋佩佩¹, 蔡徐山^{1,2△}, 张春利¹, 宦宇¹, 齐结华¹, 吴守乐¹, 乐江漫¹

1. 上海市嘉定区妇幼保健院检验科, 上海 201821; 2. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092

摘要:目的 探讨微小 RNA-92a(miR-92a)对宫颈癌细胞增殖及凋亡的影响,并对其相关的分子机制进行初步探索。方法 采用脂质体瞬转法向宫颈癌细胞 SiHa 和 HeLa 分别转染 miR-92a inhibitor(inhibitor 组)及其阴性对照(NC 组),设未处理的宫颈癌细胞为空白对照组。转染 48 h 后,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测各组细胞 miR-92a 和第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因(PTEN) mRNA 的相对表达量, CCK-8 试验和流式细胞术分别检测各组细胞活率和凋亡率, Western blotting 检测细胞通路蛋白 PTEN 和磷酸化的蛋白激酶 B(p-AKT)表达情况。结果 与空白对照组比较, inhibitor 组 miR-92a 相对表达量明显降低($P < 0.001$), PTEN mRNA 相对表达量明显升高($P < 0.01$); 与空白对照组和 NC 组比较, inhibitor 组在各时间点细胞活率明显下降($P < 0.05$), 细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$); 与空白对照组和 NC 组比较, inhibitor 组 PTEN 蛋白表达增加, p-AKT 蛋白表达降低。结论 miR-92a 通过负调控 PTEN/AKT 通路实现对宫颈癌细胞增殖与凋亡的影响。

关键词: 宫颈癌; microRNA-92a; PTEN/AKT 信号通路; 细胞增殖; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.16.006 **中图分类号:** R737.33

文章编号: 1673-4130(2022)16-1945-05

文献标志码: A

miR-92a targeting PTEN promotes the proliferation of cervical cancer cells*

JIANG Peipei¹, CAI Xushan^{1,2△}, ZHANG Chunli¹, HUAN Yu¹, QI Jiehua¹,WU Shoule¹, LE Jiangman¹

1. Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Jiading District, Shanghai 201821, China; 2. Tongji University School of Life Science and Technology, Shanghai 200092, China

Abstract: Objective To investigate the effect of microRNA-92a (miR-92a) on proliferation and apoptosis of cervical cancer cells, and to explore the related molecular mechanism. **Methods** Cervical cancer cells SiHa and HeLa were transfected with miR-92a inhibitor (inhibitor group) and its negative control (NC group) respectively by liposome transient transfection method, and untreated cervical cancer cells were set as blank control group. After 48 h of transfection, the relative expression levels of miR-92a and PTEN mRNA were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). Cell viability and apoptosis rates were measured by CCK-8 test and flow cytometry respectively. Western blotting was used to detect the protein expression levels of PTEN and p-AKT. **Results** Compared with blank control group, the relative expression level of miR-92a in inhibitor group decreased significantly ($P < 0.001$), and the relative expression level of PTEN mRNA increased significantly ($P < 0.01$). Compared with blank control group and NC group, cell viability decreased significantly ($P < 0.05$) and apoptosis rate increased significantly ($P < 0.01$) in inhibitor group. Compared with blank control group and NC group, the expression of PTEN protein increased and p-AKT protein decreased in inhibitor group. **Conclusion** MiR-92a affect the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells by negative regulation of PTEN/AKT signal pathway.

Key words: cervical cancer; microRNA-92a; PTEN/AKT signal pathway; cell proliferation; cell apoptosis

* 基金项目:上海市嘉定区第五批重点学科资助项目(2020-jdyxzdxcxk-03);上海市嘉定区卫生和计划生育委员会基金项目(QNKYJJ2018-QN-11)。

作者简介:蒋佩佩,女,硕士研究生,主要从事检验医学及肿瘤方向研究。△ 通信作者, E-mail: cai139149@126.com。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220808.1653.010.html\(2022-08-09\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220808.1653.010.html(2022-08-09))

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,其发病率仅次于乳腺癌、结直肠癌和肺癌^[1]。据世界卫生组织不完全统计,全球每年新增宫颈癌病例 50 多万例,发病率逐年上升,并呈年轻化趋势,宫颈癌每年造成约 30 万人死亡,其中 85% 发生在发展中国家,已严重影响女性的生存质量^[2]。因此,研究宫颈癌的发病机制,寻找潜在的预后和靶向治疗指标对提高宫颈癌患者的生存率具有重要意义。

微小 RNA(miRNA)是在真核细胞及病毒体内发现的一类内源性染色体上的非编码小分子单链 RNA,长度为 14~22 个核苷酸^[3]。miRNA 通过与靶 mRNA 分子的 3'-非翻译区(3'-UTR)互补序列结合诱导 mRNA 降解或抑制翻译^[4],调控基因表达。有研究表明,miRNA 广泛参与细胞发育、物质与能量代谢、免疫及炎性反应等各种生命代谢活动^[5-8]。miR-92a 属于 miR-17-92 基因簇,据报道,miR-92a 参与胃癌、骨肉瘤、鼻咽癌、肺癌、前列腺癌、结直肠癌和肝癌等多种肿瘤的发生和发展^[9-13]。有研究表明,在宫颈癌组织、患者血清及细胞系中 miR-92a 均高表达^[14-15]。ZHOU 等^[15] 研究显示,miR-92a 可通过靶向抑癌基因 FBXW7 调控宫颈癌细胞周期,促进细胞增殖,增强细胞侵袭力。动物实验证实,miR-92a 可通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)/细胞外信号调节激酶(ERK)途径降低小鼠免疫力,增强宫颈成瘤能力^[16]。

据生物信息学预测和功能分析,磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)途径的负调节因子第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因(PTEN)是 miR-92a 的可能靶标^[12]。然而,在宫颈癌中 miR-92a 经该通路靶向 PTEN 的调节作用鲜见报道。本研究通过体外干预宫颈癌细胞系 miR-92a 水平,初步探索其在 PTEN/PI3K/AKT 通路中对宫颈癌细胞的影响,并探讨相关分子机制。

1 材料与方 法

1.1 材料 宫颈癌细胞 HeLa 和 SiHa(上海攸碧艾细胞库);DMEM-高糖培养基、胎牛血清(FBS)和胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);逆转录试剂盒和 PCR 定量试剂盒(TaKaRa 公司);抗磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)、AKT、PTEN、GAPDH 抗体(美国 CST);Lipofectamine™ 2000(Lip2000,美国 Invitrogen 公司)。miR-92a-3p inhibitor 及其阴性对照、PTEN、内参 U6 和 GAPDH 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 细胞培养 从液氮中取出 HeLa 与 SiHa 细胞,快速复苏后立即重悬于含有 10%FBS 和 1%双抗(青霉素与链霉素各 100 U/mL)的 DMEM-高糖培养基中。于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中进行细胞培养。

细胞隔天更换一次培养基,细胞长至密度 80%~90% 时进行细胞传代。

1.3 细胞分组与转染 将细胞接种于培养板并用不含血清与双抗的培养基培养,待细胞密度约 60%时采用 Lip2000 进行 RNA 序列转染,分别转染 miR-92a-3p inhibitor(inhibitor 组)及其阴性对照(NC 组),以未处理的宫颈癌细胞为空白对照组。转染后将培养板置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养,6 h 后弃除含转染液的培养基,更换为完全培养基,继续培养。

1.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 转染 48 h 后提取总 RNA。用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞,加入 Trizol 试剂,冰上裂解 10 min,用移液枪吹打数次,充分裂解细胞后转移至离心管中,加入氯仿,涡旋振荡后 4℃离心,取上层水相于离心管中,加入异丙醇后 4℃离心,弃上清,收集 RNA 沉淀。沉淀用预冷 75%乙醇洗涤后离心,弃上清,沉淀于冰上晾干,加入 DEPC 水充分溶解 RNA。测定 RNA 浓度和纯度。根据逆转录试剂盒逆转录 miRNA(条件:42℃ 15 min,85℃ 5 s)和 mRNA(条件:37℃ 15 min,85℃ 5 s),得到 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。反应条件:95℃预变性 30 s;95℃变性 5 s,60℃退火延伸 34 s,共 40 个循环。按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式,分别以 GAPDH 和 U6 为内参计算 PTEN mRNA 和 miR-92a 的相对表达量。基因及其引物序列见表 1。

1.5 细胞活率 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活率。将细胞接种到 96 孔板中,待细胞过夜贴壁后进行转染,分别于转染 24、48、72 h 向每孔中加 10 μL CCK-8 试剂,每个时间段设 3 个复孔,放置培养箱内孵育 1 h,用酶标仪测定 450 nm 处各组细胞的吸光度(A)。

1.6 细胞凋亡率 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法联合流式细胞仪检测凋亡率。将每组细胞以 2×10^5 个/孔接种于六孔板,细胞培养 24 h 后行转染,转染后继续培养。于培养 36~48 h 收集细胞,1×Binding Buffer 洗涤 3 次,重悬细胞后加入 5 μL Annexin V-FITC,室温孵育 15 min,上机前 5 min 加入 5 μL PI。实验重复 3 次。

1.7 Western blotting 检测 PTEN 和磷酸化-AKT(p-AKT)蛋白表达 收集转染 48 h 的各组细胞,加入 PIPA 裂解液冰上反应 10 min,以低温 12 000 r/min 离心 10 min,提取上清蛋白裂解液。采用 BCA 法测定裂解液中蛋白浓度,调平蛋白浓度后加入上样缓冲液,煮沸蛋白。行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,湿转法将蛋白转至聚偏氟乙烯膜(PVDF 膜)。2%牛血清清蛋白(BSA)封闭 1 h,TBST 洗膜 3 次。加入一抗(PTEN、p-AKT 和 GAPDH 抗体的稀释度均为 1:1 000),于 4℃孵

育过夜,加入荧光标记二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 后置于红外激光成像仪显影。

表 1 引物序列

名称	引物序列(5'-3')
miR-92a	F:CGGTATTGCACTTGTCCCG R:AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
PTEN	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACAGGC F:GACCAGAGACAAAAAGGGAGTA R:ACAAACTGAGGATTGCAAGTTC
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCAC R:AACGCTTCACGAATTTGCGT RT:AACGCTTCACGAATTTGCGT
GAPDH	F:CTCTCTCTGTTTCGACAGTCAGC R:CCCAATACGACCAAAATCCGTT

1.8 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析,多重比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-qPCR 验证转染效率 HeLa 细胞中, inhibitor 组 miR-92a 相对表达量(0.030 ± 0.001)较 NC 组(0.980 ± 0.007)明显下降($P < 0.01$); SiHa 细胞中, inhibitor 组 miR-92a 相对表达量(0.010 ± 0.001)较 NC 组(0.990 ± 0.006)明显下降($P < 0.01$),说明 HeLa 细胞、SiHa 细胞中 miR-92a-3p inhibitor 均转染成功,可用于后续实验。见图 1。

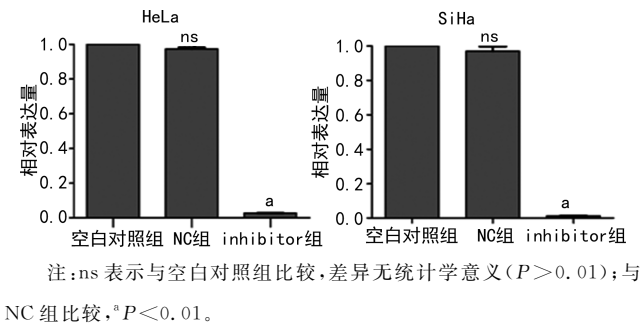


图 1 抑制 miR-92a 表达后 SiHa、HeLa 细胞 miR-92a 相对表达量

2.2 PTEN mRNA 相对表达量 HeLa 细胞中, inhibitor 组 PTEN mRNA 相对表达量(1.830 ± 0.050)较 NC 组(1.090 ± 0.050)升高($P < 0.01$)。SiHa 细胞中, inhibitor 组 PTEN mRNA 的相对表达量(1.670 ± 0.040)较 NC 组(1.040 ± 0.030)升高($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 抑制 miR-92a 表达对宫颈癌细胞活率的影响 CCK-8 试验结果显示,与空白对照组相比, inhibitor

组在转染 48、72 h 细胞活率均降低($P < 0.05$),而 NC 组和空白对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。

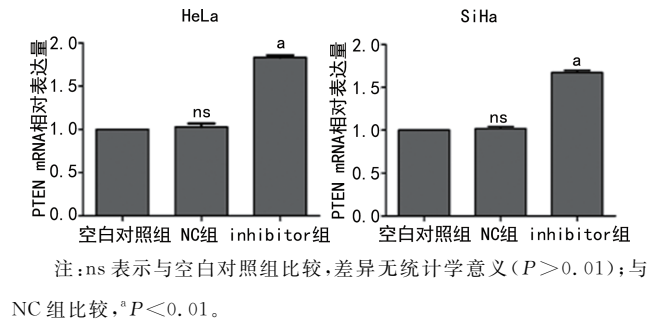


图 2 抑制 miR-92a 表达后 SiHa 和 HeLa 细胞 PTEN mRNA 相对表达量

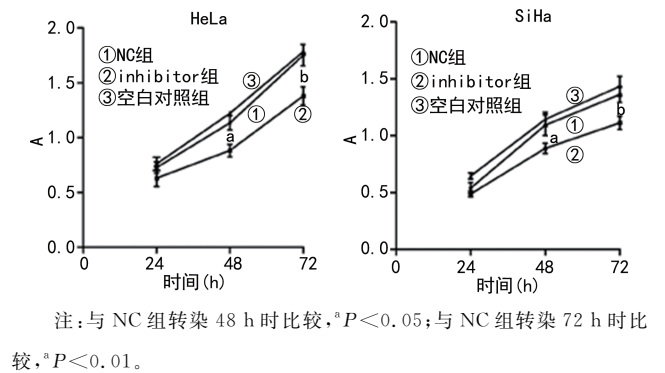


图 3 抑制 miR-92a 表达后对 SiHa 和 HeLa 细胞活率的影响

2.4 抑制 miR-92a 表达对宫颈癌细胞凋亡的影响 HeLa 细胞中, inhibitor 组的细胞凋亡率[(16.54 ± 0.78)%] $>$ 空白对照组[(4.56 ± 0.64)%] $>$ NC 组[(5.97 ± 0.34)%],差异均有统计学意义($P < 0.01$), NC 组和空白对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。SiHa 细胞中, inhibitor 组的细胞凋亡率

[(15.69 ± 0.64)%] 高于空白对照组 [(4.37 ± 0.74)%] 和 NC 组 [(5.32 ± 0.41)%], 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), NC 组和空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

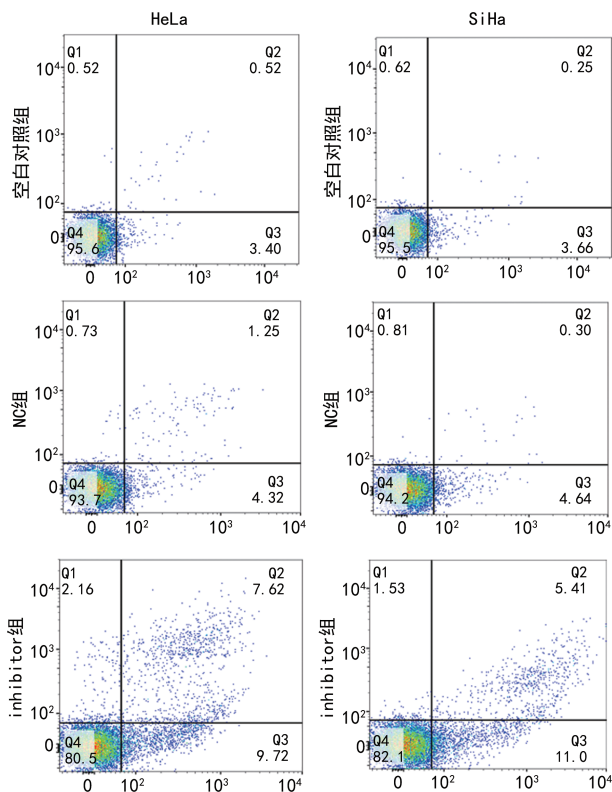


图 4 抑制 miR-92a 表达后 SiHa 和 HeLa 细胞凋亡检测结果

2.5 抑制 miR-92a 表达对宫颈癌细胞 PTEN、p-AKT 表达的影响 Western blotting 检测结果显示, 相比空白对照组, inhibitor 组 PTEN 蛋白表达升高, p-AKT 的表达下降, NC 组蛋白表达无明显变化。见图 5。

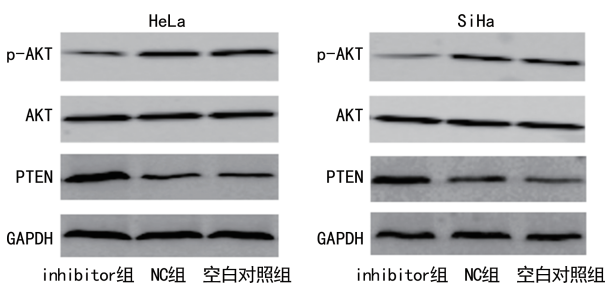


图 5 抑制 miR-92a 表达后 SiHa 和 HeLa 细胞 PTEN 和 p-AKT 蛋白表达情况

3 讨论

miRNA 是一类调控基因表达的非编码 RNA, 仅占蛋白编码基因的 1%, 而调节约 1/3 基因的表达^[17]。生物信息学分析表明, 一个 miRNA 有数百个靶基因, 同时涉及多个信号通路, miRNA 可能参与几乎所有生命代谢活动^[18]。有研究表明, 位于肿瘤相关基因组区域的 miRNA 可以发挥癌基因或抑癌基因

作用。

宫颈癌的发生、发展是多因素参与、多阶段的过程, 人乳头瘤病毒 (HPV) 感染是其最重要的发病因素, miRNA 在此过程中也发挥了重要作用。HPV-DNA 整合到宿主染色体引起染色体结构不稳定及病毒致癌蛋白的作用可能使 miRNA 的表达模式发生改变。miRNA 的基因多态性和甲基化修饰也可增加癌症的易感性^[19]。此外, 任何参与 miRNA 加工的蛋白质的改变都可能干扰前体 miRNA 的有效成熟和(或)影响 miRNA 变体 (isomiR) 的生物发生, 并可能彻底改变 miRNA 的功能。miRNA 加工蛋白的失调已在 HPV 诱导的早期癌症中被观察到, 如 Drosha、AGO2 和 TENT2 等^[20], 这表明 miRNA 可能参与了早期宫颈癌的发展。

有研究证实, miRNA 在宫颈癌中表达失调, 一些 miRNA 可促进宫颈癌的发生、发展, 如 miR-17、miR-21、miR-135、miR-150、miR-155、miR-196、miR-378、miR-425^[21]。作为 miR-17-92 基因簇家族中的一员, miR-92a 在多种肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移能力上扮演了不可或缺的角色。宫颈癌的体外实验和动物实验表明, miR-92a 可经由相关信号通路和靶基因促进细胞增殖, 增强侵袭力, 发挥致癌作用^[15-16], 但相关机制报道甚少。

为探讨 miR-92a 在宫颈癌细胞中的作用, 本研究向宫颈腺癌 HeLa 和鳞癌 SiHa 细胞转染 miR-92a inhibitor, RT-qPCR 结果表明, miR-92a 得到有效抑制。本研究中, CCK-8 试验和流式细胞术检测结果显示, 抑制 miR-92a 表达后, 宫颈癌细胞的活率下降, 凋亡率升高, 提示 miR-92a 对宫颈癌发生、发展具有潜在的促进作用。SU 等^[22] 研究进一步说明, miR-92a 可通过抑制 p21 的表达和促进细胞周期进程来促进宫颈癌细胞的增殖, 突出了 miR-92a 在宫颈癌中的临床意义。

PI3K/AKT 通路是重要的细胞增殖信号通路, PTEN 蛋白可使 PI3K 的产物三磷酸磷脂酰肌醇 (PIP3) 脱磷酸, 从而下调该通路来维持生物体内细胞增殖与凋亡的动态平衡。PTEN/PI3K/AKT 通路的失调已被证实参与多种肿瘤的发生、发展^[9-13]。生物信息学预测 PTEN 是 miR-92a 的可能靶标, 为了进一步探讨 miR-92a 是否通过 PTEN/PI3K/AKT 通路对宫颈癌细胞增殖与凋亡发挥作用, 本研究通过抑制 miR-92a 表达后观察 PTEN mRNA 的表达情况, 结果发现 PTEN mRNA 相对表达量升高, 此结果与 LI 等^[16] 研究宫颈荷瘤小鼠的癌细胞转染实验结果一致。另外, 本研究通过 Western blotting 实验发现, 抑制 miR-92a 表达后 PTEN 蛋白表达量增加, p-AKT 蛋

白表达量降低。本研究结果表明,miR-92a 可能靶向 PTEN 调控 PI3K/AKT 信号通路,miR-92a 在宫颈癌中有类似癌基因的作用。随后,本课题组尝试在宫颈癌细胞中过表达 miR-92a 以期进一步验证其作用,但由于 miR-92a 过表达效果不理想,尚未得出有效的研究结果。

综上所述,抑制 miR-92a 的表达可抑制宫颈癌细胞的增殖,促进其凋亡。miR-92a 可能通过负向调控 PTEN/PI3K/AKT 信号通路实现类似癌基因的作用。miR-92a 有可能成为宫颈癌治疗的潜在靶点。

参考文献

- [1] COHEN P A, JHINGRAN A, OAKNIN A, et al. Cervical cancer[J]. *Lancet (London, England)*, 2019, 393(1167): 169-182.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] YATES L A, NORBURY C J, GILBERT R J. The long and short of microRNA[J]. *Cell*, 2015, 153(3): 516-519.
- [4] GUO H, INGOLIA N T, WEISSMAN J S, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels[J]. *Nature*, 2010, 466(738): 835-840.
- [5] 冉茂良, 陈斌, 尹杰, 等. 睾丸发育和精子生成相关 miRNA 研究进展[J]. *遗传*, 2014, 36(7): 646-654.
- [6] JI C, GUO X. The clinical potential of circulating microRNAs in obesity[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(12): 731-743.
- [7] MACHADO I F, TEODORO J S, PALMEIRA C M, et al. miR-378a: a new emerging microRNA in metabolism[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(10): 1947-1958.
- [8] KUO G, WU C Y, YANG H Y. MiR-17-92 cluster and immunity[J]. *J Formos Med Assoc*, 2019, 118(1 Pt 1): 2-6.
- [9] YU J, NI Q, ZHANG S, et al. MicroRNA-92a promotes proliferation and invasiveness of gastric cancer cell by targeting FOXO1 gene[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2020, 66(1): 95-100.
- [10] XIAO J, YU W, HU K, et al. miR-92a promotes tumor growth of osteosarcoma by targeting PTEN/AKT signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(4): 2513-2521.
- [11] ZHANG S, YU J, SUN B F, et al. microRNA-92a targets SERTAD3 and regulates the growth, invasion, and migration of prostate cancer cells via the P53 pathway[J]. *OncoTargets Ther*, 2020, 13: 5495-5514.
- [12] KE T W, WEI P L, YE H K T, et al. miR-92a promotes cell metastasis of colorectal cancer through PTEN-mediated PI3K/AKT pathway[J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22(8): 2649-2655.
- [13] WANG L, WU J, XIE C. miR-92a promotes hepatocellular carcinoma cells proliferation and invasion by FOXA2 targeting[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20(7): 783-790.
- [14] KONG Q, TANG Z, XIANG F, et al. Diagnostic value of serum hsa-mir-92a in patients with cervical cancer[J]. *Clin Lab*, 2017, 63(2): 335-340.
- [15] ZHOU C Y, SHEN L F, MAO L, et al. miR-92a is upregulated in cervical cancer and promotes cell proliferation and invasion by targeting FBXW7[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458(1): 63-69.
- [16] LI Z H, LI L, KANG L P, et al. MicroRNA-92a promotes tumor growth and suppresses immune function through activation of MAPK/ERK signaling pathway by inhibiting PTEN in mice bearing U14 cervical cancer[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(7): 3118-3131.
- [17] LEE I, AJAY S S, YOON J I, et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites[J]. *Genome Res*, 2009, 19(7): 1175-1183.
- [18] 王虹. miR-92a 在宫颈癌中的表达及其意义[D]. 青岛: 青岛大学, 2016.
- [19] 梁文丽, 刘植华. miRNA 在宫颈癌中的研究进展[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2020, 30(21): 196-198.
- [20] SNOEK B C, BABION I, KOPPERS-LALIC D, et al. Altered microRNA processing proteins in HPV-induced cancers[J]. *Curr Opin Virol*, 2019, 39: 23-32.
- [21] 徐洁欢, 廉萍, 李耀军, 等. miRNA 在宫颈癌中的表达及临床意义研究进展[J]. *中国医药导报*, 2020, 17(27): 55-57.
- [22] SU Z, YANG H, ZHAO M, et al. MicroRNA-92a promotes cell proliferation in cervical cancer via inhibiting p21 expression and promoting cell cycle progression[J]. *Oncol Res*, 2017, 25(1): 137-145.

(收稿日期: 2021-09-09 修回日期: 2022-06-11)