

miRNA-34b 对子宫内膜癌细胞凋亡、侵袭、迁移的影响及作用机制

李晓妍¹, 高秀娟², 刘雪洁¹

(1. 保定市第二中心医院妇科, 河北保定 072750; 2. 承德医学院附属医院妇科, 河北承德 067020)

摘要: 目的 探究 miR-34b 对子宫内膜癌 (endometrial cancer) 凋亡、迁移、侵袭的影响及对 Jag1/Cyclin D1 信号通路的影响。方法 将人子宫内膜癌细胞 AN3CA 细胞分为对照组、NC 组和 miR-34b 组。通过流式细胞技术、Transwell 实验分别检测各组细胞凋亡、迁移能力和侵袭能力; 通过定量聚合酶链反应 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 及 Western blot 检测各组细胞 Jagged-1 蛋白 (Jag1) 及其靶基因 G1/S- 特异性周期蛋白 -D1 (Cycling D1) mRNA 和蛋白的表达水平; 通过裸鼠荷瘤实验分析 miR-34b 对肿瘤生长的影响。结果 对照组、NC 组和 miR-34b 组细胞凋亡比例分别为 $5.6\% \pm 0.12\%$, $5.80\% \pm 0.22\%$ 和 $19.4\% \pm 0.51\%$ 。miR-34 组细胞凋亡比例高于对照组, 差异具有统计学意义 ($t=8.325$, $P < 0.01$); 对照组、NC 组和 miR-34b 组细胞迁移数分别为 322.15 ± 13.71 个, 327.67 ± 9.14 个和 162.19 ± 7.49 个, miR-34b 组细胞迁移数低于对照组, 差异具有统计学意义 ($t=7.945$, $P < 0.01$); 对照组、NC 组和 miR-34b 组细胞侵袭数分别为 357.6 ± 14.11 个, 364.05 ± 16.12 个和 157.58 ± 8.77 个, miR-34b 组细胞侵袭数低于对照组, 差异具有统计学意义 ($t=7.643$, $P < 0.01$); qPCR 结果表明对照组、NC 组和 miR-34b 组 Jag1 mRNA 表达为 2.75 ± 0.21 , 2.67 ± 0.14 和 1.19 ± 0.19 , miR-34b 组低于对照组, 差异具有统计学意义 ($t=8.434$, $P < 0.01$); 对照组、NC 组和 miR-34b 组蛋白表达为 1.71 ± 0.11 , 1.77 ± 0.24 和 0.69 ± 0.16 , miR-34b 组低于对照组, 差异具有统计学意义 ($t=7.895$, $P < 0.01$); 对照组、NC 组和 miR-34b 组 Cyclin D1 mRNA 表达为 1.29 ± 0.13 , 1.32 ± 0.11 和 0.59 ± 0.13 , miR-34b 组低于对照组, 差异具有统计学意义 ($t=9.124$, $P < 0.01$); 对照组、NC 组和 miR-34b 组蛋白表达为 1.81 ± 0.18 , 1.79 ± 0.14 和 1.29 ± 0.16 , miR-34b 组低于对照组, 差异具有统计学意义 ($t=8.227$, $P < 0.01$); 裸鼠荷瘤实验表明过表达 miR-34b 裸鼠肿瘤生长曲线与对照组差异有统计学显著性意义, 并且肿瘤体积显著低于对照组 ($t=8.184$, $P < 0.01$)。结论 miR-34b 可以促进人子宫内膜癌细胞的凋亡, 抑制细胞迁移和侵袭能力, 其机制与 Jag1/Cyclin D1 信号通路活性的抑制相关。

关键词: miR-34b; 人子宫内膜癌; 凋亡; 迁移与侵袭; Jag1/Cyclin D1 信号通路

中图分类号: R737.33; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 06-088-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.06.016

Effect and Mechanism of miR-34b on Apoptosis, Invasion and Migration of Endometrial Cancer Cells

LI Xiao-yan¹, GAO Xiu-juan², LIU Xue-jie¹

(1. Department of Gynaecology, the Second Central Hospital of Baoding, Hebei Baoding 072750, China; 2. Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Hebei Chengde 067020, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of miR-34b on apoptosis, migration and invasion of endometrial cancer cells. **Methods** Human endometrial cancer cell line AN3CA was divided into control group, NC group and miR-34b group. The apoptosis, migration and invasion of each group were detected by flow cytometry and Transwell experiment respectively. The mRNA and protein expression levels of Notch ligand (Jag1) and its target gene G1/S-specific cyclin-D1 were detected by qPCR and Western blot. The effect of miR-34b on tumor growth was analyzed by tumor bearing experiment in nude mice. **Results** The apoptosis rates of control group, NC group and miR-34b group were $5.6\% \pm 0.12\%$, $5.80\% \pm 0.22\%$ and $19.4\% \pm 0.51\%$, respectively. The proportion of apoptosis in miR-34 group was higher than that in control group, the difference was statistically significant ($t = 8.325$, $P < 0.01$). The number of cell migration in the control group, NC group and miR-34b group were 322.15 ± 13.71 , 327.67 ± 9.14 and 162.19 ± 7.49 , respectively. The number of cell migration in miR-34b group

基金项目: 河北省医学科学研究课题 (编号: 20200265), 资助单位: 河北省卫生健康委员会。

作者简介: 李晓妍 (1989-), 女, 研究生, 主治医师, 研究方向: 妇科肿瘤, E-mail: gzomltduld418@21cn.com。

通讯作者: 高秀娟 (1984-), 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 子宫内膜异位症及妇科肿瘤。

was lower than that in the control group, and the difference was statistically significant ($t = 7.945, P < 0.01$). The number of cell invasion in the light group, NC group and miR-34b group were 357.6 ± 14.11 , 364.05 ± 16.12 and 157.58 ± 8.77 , respectively, and the number of cell invasion in miR-34b group was lower than that in the control group, and the difference was statistically significant ($t = 7.643, P < 0.01$). QPCR results showed that the expression of Jag1 mRNA in control group, NC group and miR-34b group was 2.75 ± 0.21 , 2.67 ± 0.14 and 1.19 ± 0.19 , respectively. The expression of Jag1 mRNA in miR-34b group was lower than that in control group, and the difference was statistically significant ($t = 8.434, P < 0.01$). The protein expression in control group, NC group and miR-34b group was 1.71 ± 0.11 , 1.77 ± 0.24 and 0.69 ± 0.16 , respectively. The expression of Jag1 mRNA in miR-34b group was lower than that in control group, and the difference was statistically significant ($t = 7.895, P < 0.01$). The expression of cyclin D1 mRNA in control group, NC group and miR-34b group was 1.29 ± 0.13 , 1.32 ± 0.11 and 0.59 ± 0.13 , respectively. The expression of cyclin D1 mRNA in miR-34b group was lower than that in control group, and the difference was statistically significant ($t = 9.124, P < 0.01$). The protein expression in control group, NC group and miR-34b group was 1.81 ± 0.18 , 1.79 ± 0.14 and 1.29 ± 0.16 , respectively. The expression of cyclin D1 mRNA in miR-34b group was lower than that in control group, the difference was statistically significant ($t = 8.227, P < 0.01$). The tumor bearing experiment in nude mice showed that the tumor growth curve of overexpressing miR-34b nude mice was significantly different from that of the control group, and the tumor volume was significantly lower than that of the control group ($t = 8.184, P < 0.01$). **Conclusion** MiR-34b can promote apoptosis, inhibit cell migration and invasion of human endometrial cancer cells, and it is related to the inhibition of Jag1/cyclin D1 signal pathway activity.

Keywords: miR-34b; human endometrial carcinoma; apoptosis; migration and invasion; Jag1/cyclin D1 signal pathway

子宫内膜癌(endometrial cancer)是女性生殖道常见的恶性肿瘤,由多种肿瘤类型组成,具有不同的光镜特征、分子遗传学改变和预后^[1-2]。子宫内膜癌恶化后会出现转移,可转移至肺、肝等重要器官,可能对患者生命造成严重威胁^[3]。表观遗传学研究表明 miRNA-34b 在子宫内膜癌等多种癌症中发挥重要作用^[4-6]。在一项临床样本的研究中,通过 TaqMan OpenArray 技术测量了子宫内膜癌相关 miRNA 的表达谱系,结果筛选出 miRNA-34b 为子宫内膜癌的独立风险因素^[4];在细胞水平上,研究表明 miRNA-34b 作为乳腺癌细胞雌激素依赖性生长的肿瘤抑制因子,可抑制乳腺癌肿瘤生长和细胞增殖^[5],同时研究表明 miRNA-34b 通过去甲基化、活性染色质修饰和 AKT 信号通路的调控抑制前列腺癌的发生发展^[6],由此可见 miRNA-34b 是子宫内膜癌等多种癌症中的重要调控分子。Jagged-1 蛋白(Jag1)是细胞表面配体之一,在细胞命运决定中起着关键作用,在整个发育过程中和许多器官系统中表达活跃^[7]。在对于来自 47 例 I ~ IV 期子宫内膜癌手术的女性子宫内膜样本分析研究发现,Jag 家族成员如 Jag1 mRNA, Jag2 mRNA 表达水平发生了显著的变化^[8]。基于上述背景本研究拟通过细胞实验探究转染 miR-34b 对子宫内膜癌增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响,并探究对 Jag1/Cyclin D1 信号通路在此过程发挥的影响,同时通过裸鼠实验在体内探究 miR-34b 对肿瘤生长的影响,为 miR-34b 在子宫内膜癌细胞中发挥的作用提供分子机制和理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象 细胞:人子宫内膜癌细胞系 AN3CA 购自国家模式与特色实验细胞资源库/国家科技资源共享服务平台。裸鼠:SPF 级裸鼠,雌性, 20 ± 2 g, 20 只,购于中生北动(北京)科技发展有限公司,使用许可证号:SYXK(京)2020-0051,饲养条件为:12/12h 昼夜照明,温度 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度 $55\% \pm 5\%$ 条件饲养,自由饮水饮食,适应性饲养一周。

1.2 仪器与试剂 CytoFLEX 流式细胞仪(德国贝克曼公司);7500 qPCR 仪(美国 ABI 公司);western blot 电泳仪(美国 bio-rad 公司);实验耗材(美国 corning 公司);MEM(货号:PM150467 Gibco),FBS(货号:164210-500, Gibco),P/S(货号:PB180120, Gibco);凋亡试剂盒(货号:C1062S,碧云天公司);Transwell 试剂盒(货号:BL710A, Biosharp 公司);Jag1 抗体(ab8805),Cyclin D1 抗体(ab109536),GAPDH 抗体(ab16663, Abcam, 英国)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及转染方法:人子宫内膜癌细胞 AN3CA 细胞培养条件:空气 95%, CO_2 5ml/dl,温度: 37°C , 培养密度: 1×10^5 cells/T25 培养瓶,换液及传代:每隔 1 ~ 2 天更换全新培养液,3 天传代一次,传代按照 1 : 3 比例传代。PI3K 激活剂终浓度为 $50 \mu\text{g/ml}$,转染条件:严格按照 LipofectamineTM 3000 说明书对细胞进行转染 NC 质粒和 miR-34b 质粒,转染 8 h 后换液。细胞处理:对照组细胞正常培养,NC 组细胞转染 NC 质粒,miR-34b 组细胞转染 miR-34b 质粒。

1.3.2 细胞凋亡实验: 用不含 EDTA 的胰酶消化后, 300 g, 4℃离心 5 min 收集细胞。用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 每次均需 300 g, 4℃离心 5 min。收集 $(1 \sim 5) \times 10^5$ 个/ml 细胞。吸弃 PBS, 加入 100 μ l 1×Binding Buffer 重悬细胞。严格按照凋亡试剂盒加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l PI Staining Solution, 轻轻混匀。避光、室温孵育 15 min。加入 400 μ l 1×Binding Buffer, 混匀后放置于冰上, 为防止荧光物质发生淬灭, 样品在 1 h 内用流式细胞仪检测。

1.3.3 Transwell 实验检测细胞迁移及细胞侵袭: 将细胞培养至对数生长期, 用胰蛋白酶消化, 重新铺至迁移实验和侵袭实验的小孔中, 迁移实验小孔膜上不包被基质蛋白, 侵袭实验中需要在微孔膜上额外包被基质蛋白。严格按照 transwell 试剂盒进行实验, 取 1L 双蒸水, 把 PBS 粉末全部溶解, 配制后可以 4℃保存备用, 取出准备好的细胞, 吸出培养液, PBS 清洗 3 次; 用棉签擦去上室面细胞, 取 2ml 固定液加入孔板, 放入 Transwell, 固定 15 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 在孔板中加入 1ml 染色液, 使 Transwell 浸泡在液体中, 染色 10 min; 弃掉染色液, 加入 1ml 调色液 A, 加一滴调色液 B, 快速混匀; 弃掉所有液体, 用 PBS 清洗 1 次, 用刀片取下膜, 放在载玻片上, 加 1~2 滴封片液, 盖上盖玻片, 显微镜下 400× 观察, 随机选取 3 个视野进行计数。

1.3.4 qPCR 检测 mRNA 表达水平: qPCR 检测各组细胞的 Jag1 和 Cyclin D1 表达水平。将细胞用 TRIZOL 法冰上无酶环境提取总 RNA, 后反转录合成 cDNA 后, 进行 PCR 扩增。95℃预变性 10 min, 95℃变性 15 s, 55℃退火 15 s, 共 40 个循环。引物序列见表 1。每个样品重复 3 次检测, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法计算各个指标的相对表达量, 用内参 β -actin 对其标准化处理。

表 1 qPCR 检测中不同基因的引物序列

基因名	引物序列
Jag1	正向序列: 5'-CAAACACCAGCAGAAAGCCC-3' 反向序列: 5'-TAAGTCAGCAACGGCCTCAG-3'
Cyclin D1	正向序列: 5'-GGGCCACTTGCATGTTCT-3' 反向序列: 5'-CAGGTTCCACTTGAGCTTGTTCAC-3'
β -actin	正向序列: 5'-TGGCACCAGCACAATGAA-3' 反向序列: 5'-CTAAGTCATAGTCCGCTAGAAGCA-3'

1.3.5 Western blot 检测蛋白表达水平: 取适量细胞, 加入 1ml RIPA 提取裂解液制成蛋白提取液, 使用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 5×SDS 的蛋白上样缓冲液煮沸后, 分装保存于 -80℃冰箱备用。

将样品分别加入不同的泳道进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 浓缩胶电压 80V, 分离胶电压 120V, 后转至 PVDF 膜, 用 5%BSA 封闭。加入特异性一抗 Jag1 (1:1500), Cyclin D1 (1:1000), GAPDH (1:10000), 于 4℃冰箱过夜。TBST 洗膜 3 次, 加入特异性的羊抗兔二抗 (1:2000), 孵育 1h。TBST 洗膜 3 次, 采用 ECL 化学发光液曝光显影, 使用 Image J 图像分析软件系统进行半定量分析。

1.3.6 裸鼠荷瘤实验: 取对数生长期的人子宫内膜癌细胞系以 PBS 缓冲液调整细胞至 5×10^7 个/ml 的细胞悬液。将所得细胞悬液以 1ml 无菌注射器接种于 20 只裸鼠右侧腋下皮下, 注入细胞悬液并采用无菌棉签压紧进针口, 迅速拔除注射器针头, 每只裸鼠注射 0.2ml。对照组 ($n=10$) 注射野生型 AN3CA 细胞, miR34b 组裸鼠 ($n=10$) 注射转染 miR-34b 的 AN3CA 细胞, 7 天后测量肿瘤体积, 建模成功的判断标准: 皮下瘤块体积 $\geq 0.5\text{cm}^3$, 肿瘤生长达不到标准的进行裸鼠不进入实验, 成瘤后每 3 天用游标卡尺测量皮下瘤块的长短径, 计算瘤体积 = 长径 \times 短径² $\times 1/2$ ^[5,8], 连续 21 天, 绘制两组裸鼠肿瘤生长曲线及每只裸鼠肿瘤生长曲线。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 软件 26.0 对数据进行统计学分析, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。数据经正态性检验和方差齐性检验, 对连续性计量资料采用单因素方差分析 (One Way ANOVA) 进行比较, 非连续性计量资料采用秩和检验进行多组间比较, 两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 采用 Graphpad 9 软件进行统计学图片绘制。

2 结果

2.1 miR-34b 对人子宫内膜癌 AN3CA 细胞凋亡的影响 见图 1。流式细胞检测各组细胞凋亡, 结果表明对照组、NC 组和 miR-34b 组细胞凋亡比例分别为 $5.6\% \pm 0.12\%$, $5.80\% \pm 0.22\%$ 和 $19.4\% \pm 0.51\%$, 相比于对照组, miR-34b 组细胞凋亡比例显著升高, 差异具有统计学意义 ($t=8.325, P < 0.01$), 而 NC 组与对照组差异无统计学意义 ($t=0.243, P > 0.05$)。

2.2 miR-34b 对人子宫内膜癌细胞 AN3CA 迁移和侵袭能力的影响 见表 2, 图 2。Transwell 实验检测子宫内膜癌细胞迁移和侵袭能力, 与对照组相比, miR-34b 组细胞迁移, 侵袭能力均显著降低, 差异均具有统计学意义 ($t=7.945, 7.643$, 均 $P < 0.01$); 而 NC 组与对照组差异无统计学意义 ($t=0.185, 0.193$, 均 $P > 0.05$)。

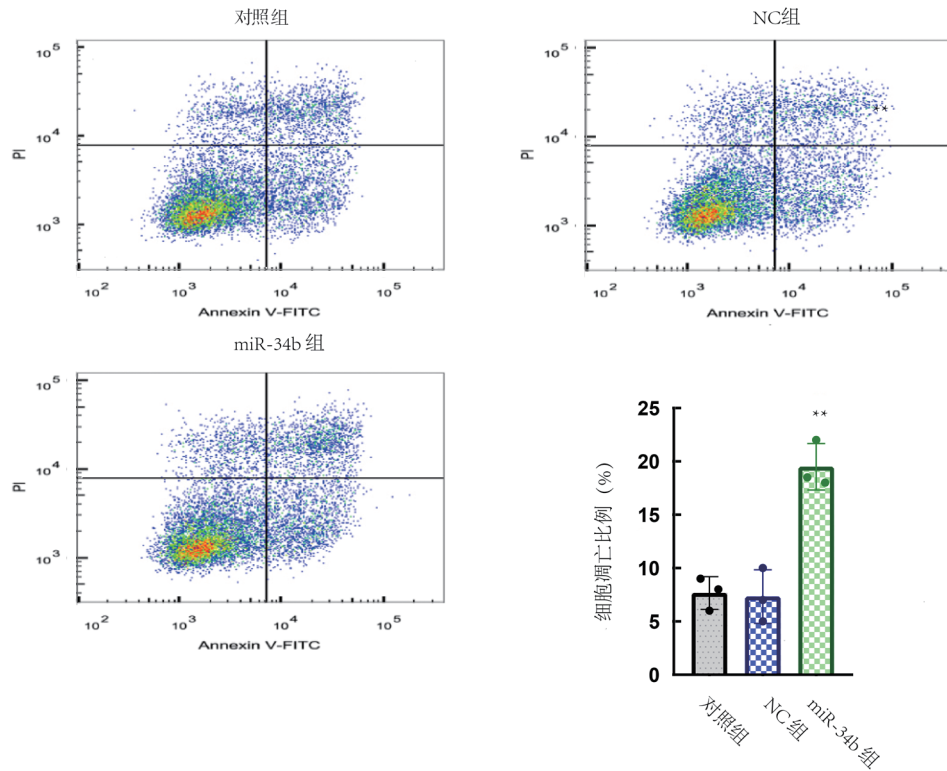


图1 miR-34b对子宫内腺癌细胞AN3CA细胞凋亡的影响(与对照组相比** $P < 0.01$)

表2 miR-34b对子宫内腺癌细胞AN3CA细胞迁移与侵袭的影响($\bar{x} \pm s$)

类别	对照组	NC组	miR-34b组
细胞迁移数(个)	322.15 ± 13.71	327.67 ± 9.14	162.19 ± 7.49
细胞侵袭数(个)	357.6 ± 14.11	364.05 ± 16.12	157.58 ± 8.77

2.3 miR-34b对子宫内腺癌细胞AN3CA细胞Jag1/Cyclin D1信号通路的影响 见表3。通过qPCR和Western blot检测各组细胞Jag1/Cyclin D1

信号通路的变化,结果与对照组相比,miR-34b组Jag1及Cyclin D1 mRNA相对表达均有降低趋势,差异具有统计学显著性意义($t=8.434, 9.124$, 均 $P < 0.01$),NC组与对照组差异无统计学意义($t=0.241, 0.375$, 均 $P > 0.05$),与对照组相比,miR-34b组Jag1及Cyclin D1蛋白相对表达均有降低趋势,差异有统计学意义($t=7.895, 8.227$, 均 $P < 0.01$),NC组与对照组差异无统计学意义($t=0.312, 0.423$, 均 $P > 0.05$)。

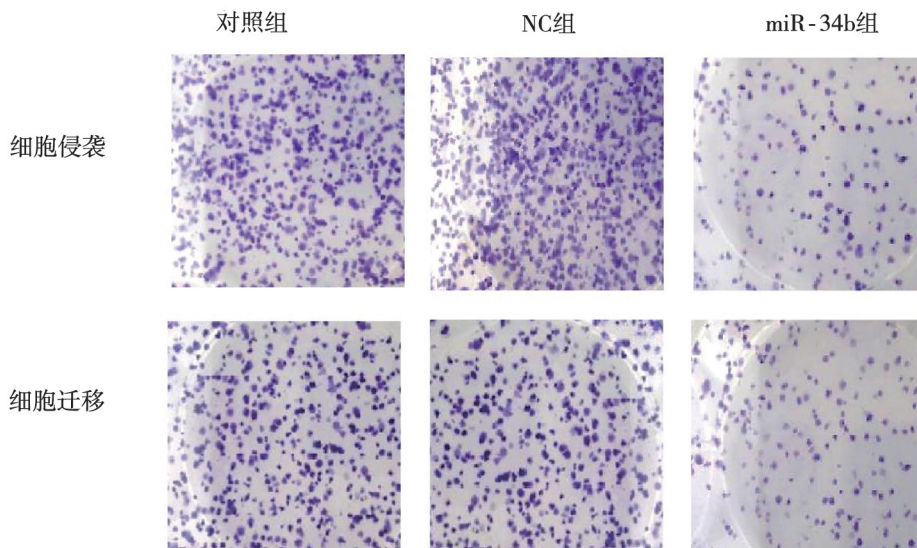


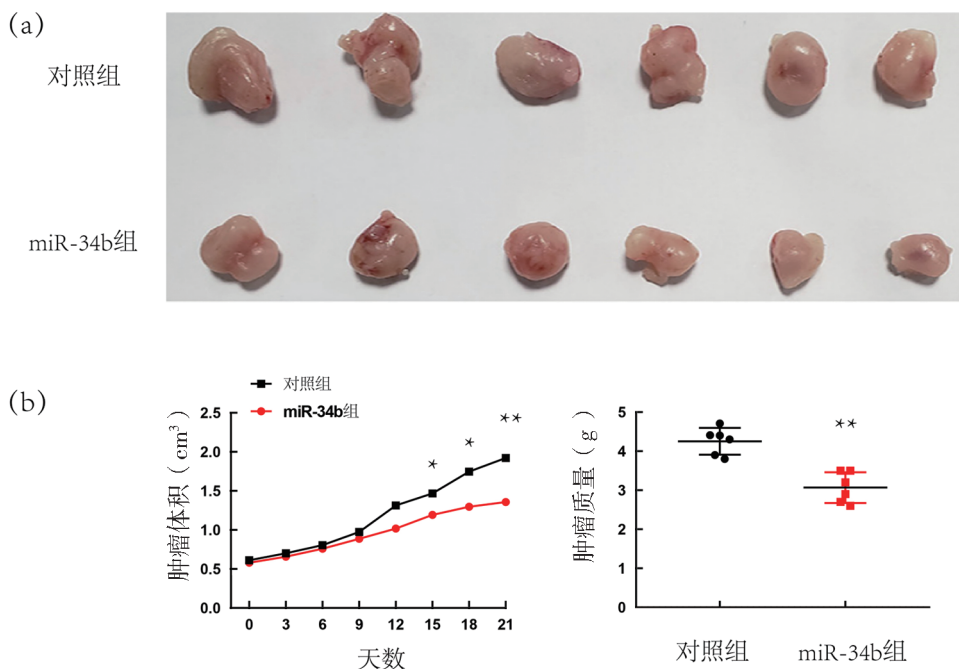
图2 miR-34b对子宫内腺癌细胞AN3CA迁移和侵袭能力的影响

表3 miR-34b对AN3CA细胞Jag1/Cyclin D1 mRNA及蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$)

类别	对照组	NC组	miR-34b组
mRNA 相对表达 (Jag1)	2.75 ± 0.21	2.67 ± 0.14	1.19 ± 0.19
蛋白相对表达 (Jag1)	1.71 ± 0.11	1.77 ± 0.24	0.69 ± 0.16
mRNA 相对表达 (Cyclin D1)	1.29 ± 0.13	1.32 ± 0.11	0.59 ± 0.13
蛋白相对表达 (Cyclin D1)	1.81 ± 0.18	1.79 ± 0.14	1.29 ± 0.16

2.4 miR-34b对裸鼠肿瘤生长的影响 裸鼠荷瘤后

精神状态良好、活动频繁、饮食、饮水量正常，荷瘤7天后，各组有6只裸鼠肿瘤体积 $\geq 0.5\text{cm}^3$ ，成瘤率60%，用于肿瘤生长曲线测量和绘制。miR-34b组裸鼠肿瘤体积显著低于对照组裸鼠，见图3a；miR-34b组裸鼠肿瘤平均生长速度显著受到抑制，见图3b；从第15天开始肿瘤体积显著低于对照组，在第21天时肿瘤质量显著低于对照组小鼠，结果差异具有统计学意义 ($t=7.324, P < 0.01$)。



A. 第21天两组裸鼠肿瘤体积比较；B. 两组裸鼠肿瘤质量及裸鼠肿瘤生长曲线

图3 miR-34b对裸鼠肿瘤生长的影响 (注 * 代表与对照组相比, ** $P < 0.01$)

3 讨论

子宫内膜癌 (endometrial carcinoma) 是最常见的女性生殖系统肿瘤之一，发生于子宫内膜的一组上皮性恶性肿瘤，好发于围绝经期和绝经后女性，每年有接近20万的新发病例，并是导致死亡的第三位常见妇科恶性肿瘤^[9]。子宫内膜癌的发展与雌激素相对于孕酮过量等因素密切相关，由于子宫内膜癌是一种雌激素依赖性肿瘤类型，其发病风险增加与肥胖、糖尿病、非对抗性雌激素使用、未产妇、初潮早期和绝经晚期有关，年龄增长也是重要的危险因素，手术是子宫内膜癌最主要的治疗方法，是治疗子宫内膜癌有效的方法之一。单纯放疗仅适用于年老体弱及有严重内科并发症不能耐受手术或禁忌手术者，以及Ⅲ期以上不宜手术者，包括腔内及体外照射化疗很少单独应用于子宫内膜癌的治疗，多用于特殊类型的子宫内膜癌，如浆液性、透明细胞癌等；或是复发病例；或是具有复发高危因素的手术患者，如G3，ER/PR阴性者，化疗中主要

应用的药物有铂类、紫杉醇以及阿霉素类药物^[10]。

子宫内膜癌等大量癌症的发生伴随着表观遗传学变化、DNA甲基化、组蛋白修饰以及microRNA的调控都是子宫内膜癌发展的重要因素，表观遗传学不仅有助于子宫内膜癌的早期诊断，对于分子靶向治疗也有良好的应用前景^[11]，如微小核糖核酸 (MicroRNA, miRNA) 的调控，miRNA是一类由内源基因编码的长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子，它们在动植物中参与转录后基因表达调控^[12-14]。研究表明miRNA-34b, miRNA-383-5p, miRNA-10b-5p和miRNA-34c-3p等8种microRNA在子宫内膜癌中发生表达水平的变化并可以作为独立的风险生物标志物^[4]，其中miRNA-34b参与了多种肿瘤的发生发展，miRNA-34b基因启动子的高甲基化可能在胃癌的发生发展中起重要作用，胃癌组患者miRNA-34b基因启动子DNA甲基化阳性率达到了77.5%^[15]；在大肠癌中miRNA-34b出现表观遗传沉默现象，miR-34b CpG岛的甲

基化在大肠癌细胞系 100% 沉默, 在原发性大肠癌肿瘤 90% 患者中经常观察到沉默现象, 在正常结肠黏膜中没有观察到^[16]; 细胞学实验还发现 miR-34b 可通过多个靶点抑制葡萄膜黑色素瘤细胞增殖和迁移, miR-34b/c 被证实下调 c-Met, p-Akt 和细胞周期相关蛋白的表达^[17], 由此可见, 对 miR-34b 的探究可能是肿瘤研究的重要方向。本研究通过人子宫癌细胞构建过表达 miR-34b 细胞模型, 探究了 miR-34b 对子宫内膜癌细胞增殖迁移的作用, 结果发现 miR-34b 可以显著抑制肿瘤细胞的迁移与侵袭, 同时增加了细胞的凋亡比例, 提示 miR-34b 对子宫内膜癌细胞的恶性生物学功能具有抑制作用。进一步, 本研究通过裸鼠构建小鼠荷瘤模型, 在体内验证细胞学实验结果。结果显示在成模后 miR-34b 组小鼠生长始终慢于对照组小鼠, 肿瘤体积于第 15 天出现显著的统计学差异, 于第 21 天肿瘤质量出现显著的差异, 提示在体内 miR-34b 也可以发挥肿瘤细胞生长的抑制作用。

肿瘤的发生发展与细胞周期调控细胞关系比较密切^[18], 研究表明细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 是 Jag1 介导的 Notch 信号在乳腺癌中的直接靶点, Jag1 下调降低 Notch 与 cyclin D1 启动子的直接结合, 降低 cyclin D1 的表达, 并通过 cyclin D1 依赖性 G1/S 检查点抑制细胞周期进程, 此外在三阴性乳腺癌表达数据集中, cyclin D1 和 Jag1 表达相关^[19-20]。也有研究表明 Jagged-1 逆转了过度表达 FBXW7 对细胞增殖和凋亡的影响, 而 Notch 抑制剂 (DAPT) 可以抵消过表达 STYX 对细胞增殖和凋亡的影响, 可见 Jag1 在宫颈鳞癌、子宫内膜癌发生发展及正常组织的生长分化中发挥重要执行者的作用^[21]。本研究通过 qPCR 和 western blot 实验进一步表明, 过表达 miR-34b 后细胞内 Jag1 mRNA 及蛋白以及 Jag1 靶基因 Cyclin D1 的 mRNA 及蛋白表达水平显著降低, 由此推测 Jag1/Cyclin D1 信号通路可能收到 miR-34b 调控, 并且是抑制子宫内膜癌细胞恶性生物学行为的重要通路之一。

综上, 本研究表明 miR-34b 具有促进子抑制子子宫内膜癌细胞凋亡及抑制迁移和侵袭的作用, 其机制抑制 PI3K/Jag1/Cyclin D1 信号通路活性相关。本研究拟进一步获取临床样本, 对 PI3K/Jag1/Cyclin D1 蛋白在癌组织和癌旁组织进行免疫荧光等实验研究, 从原位上证实 miR-34b 对子宫内膜癌的调控作用, 而为临床诊断提供理论基础。

参考文献:

- [1] DI CRISTOFANO A, ELLENSON L H. Endometrial carcinoma [J]. Annual Review of Pathology, 2007, 2: 57-85.
- [2] BIAN X, GAO J, LUO F, et al. PTEN deficiency

- sensitizes endometrioid endometrial cancer to compound PARP-PI3K inhibition but not PARP inhibition as monotherapy[J]. Oncogene, 2018, 37(3): 341-351.
- [3] MURALI R, SOSLOW R A, WEIGELT B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types[J]. Lancet Oncology, 2014, 15(7): E268-E278.
 - [4] ROMAN-CANAL B, MOIOLA C P, GATIUS S, et al. EV-associated miRNAs from peritoneal lavage are a source of biomarkers in endometrial cancer[J]. Cancers, 2019, 11(6): 839.
 - [5] LEE Y M, LEE J Y, HO C C, et al. MiRNA-34b as a tumor suppressor in estrogen-dependent growth of breast cancer cells[J]. Breast Cancer Research, 2011, 13(6): R116.
 - [6] MAJID S, DAR A A, SAINI S, et al. MiRNA-34b inhibits prostate cancer through demethylation, active chromatin modifications, and AKT pathways[J]. Clinical Cancer Research, 2013, 19(1): 73-84.
 - [7] GROCHOWSKI C M, LOOMES K M, SPINNER N B. Jagged1 (JAG1): structure, expression, and disease associations[J]. Gene, 2016, 576(1 Pt 3): 381-384.
 - [8] LACHEJ N, JONUŠIENĖ V, MAŽEIKĖ A, et al. Changes in the expression of Notch and Wnt signalling molecules in human endometrial cancer[J]. Acta Medica Lituanica, 2019, 26(3): 181-190.
 - [9] AKHTAR M, AL HYASSAT S, ELAIWY O, et al. Classification of endometrial carcinoma: new perspectives beyond morphology[J]. Advances in Anatomic Pathology, 2019, 26(6): 421-427.
 - [10] URICK M E, BELL D W. Clinical actionability of molecular targets in endometrial cancer[J]. Nature Reviews Cancer, 2019, 19(9): 510-521.
 - [11] CHEN Liang, HEIKKINEN L, WANG Changliang, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools[J]. Briefings in Bioinformatics, 2019, 20(5): 1836-1852.
 - [12] CORREIA DE SOUSA M, GJORGJEVA M, DOLICKA D, et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(24): 6249.
 - [13] VISHNOI A, RANI S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2017, 1509: 1-10.
 - [14] BERNARDO B C, OOI J Y, LIN R C, et al. MiRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart[J]. Future Medicinal Chemistry, 2015, 7(13): 1771-1792.
 - [15] 李阳, 岳宏宇, 刘文天, 等. 胃癌组织中微 RNA-34b/c 和微 RNA-124a 基因的甲基化 [J]. 中华医学杂志, 2011, 91(23): 1640-1642.
 - LI Yang, YUE Hongyu, LIU Wentian, et al. DNA methylation of microRNA-34b/c and microRNA-124a in gastric cancer[J]. National Medical Journal of China, 2011, 91(23): 1640-1642.
 - [16] TOYOTA M, SUZUKI H, SASAKI Y, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer[J]. Cancer Research, 2008, 68(11): 4123-4132.
 - [17] DONG Feng, LOU Dinghua. MicroRNA-34b/c suppresses uveal melanoma cell proliferation and migration through multiple targets [J]. Mol Vis, 2012, 18: 537-46.

(下转第 98 页)

测, 今后将通过动态监测指标变化情况, 结合影像学结果及患者临床表现进一步探讨二者在预后中的作用。

参考文献:

- [1] ZHONG Tingting, WANG Gang, WANG Xiaoqin, et al. Serum calcium, albumin, globulin and matrix metalloproteinase-9 levels in acute cerebral infarction patients[J]. World Journal of Clinical Cases, 2021, 9(30): 9070-9076.
- [2] JIA Xue, WANG Wen, WU Bo, et al. Intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke with extended time window[J]. Chinese Medical Journal, 2021, 134(22): 2666-2674.
- [3] WANG Chen, WANG Wanting, JI Jianling, et al. Safety of intravenous thrombolysis in stroke of unknown time of onset: A systematic review and meta-analysis[J]. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 2021, 52(4): 1173-1181.
- [4] 张信远, 李德珠, 林瑶, 等. LncRNA NEAT1 在中枢神经系统疾病中的研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2020, 47(11):1174-1182.
ZHANG Xinyuan, LI Dezhu, LIN Yao, et al. Research progress of long non-coding RNA NEAT1 in the central nervous system diseases [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2020, 47(11):1174-1182.
- [5] WANG Han, CAO Xianning, WEN Xiaoqing, et al. Transforming growth factor- β 1 functions as a competitive endogenous RNA that ameliorates intracranial hemorrhage injury by sponging microRNA-93-5p[J]. Molecular Medicine Reports, 2021, 24(1): 499.
- [6] YANG Jing, WU Lin, LIU Shanshou, et al. Long non-coding RNA NEAT1 promotes lipopolysaccharide-induced injury in human tubule epithelial cells by regulating miR-93-5p/TXNIP axis[J]. Medical Microbiology and Immunology, 2021, 210(2/3): 121-132.
- [7] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9):666-682.
Chinese Society of Neurology, Chinese Stroke Society. Chinese guidelines for diagnosis and treatment of acute ischemic stroke 2018 [J]. Chinese Journal of Neurology, 2018, 51(9):666-682.
- [8] ESKIOGLOU E, HUCHMANDZADEH M M, AMIGUET M, et al. National institutes of health stroke scale Zero strokes[J]. Stroke, 2018, 49(12): 3057-3059.
- [9] GHODSI H, ABOUEI MEHRIZI M A, KHOSHDEL A R, et al. Evaluation of combining Alberta Stroke Program Early CT Score (ASPECTS) with mean platelet volume, plateletcrit, and platelet count in predicting short- and long-term prognosis of patients with acute ischemic stroke[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2021, 208:106830.
- [10] 白重阳, 董轲. 急性脑梗死患者血栓弹力图与凝血功能的关系 [J]. 海南医学, 2020, 31(15):1923-1926.
BAI Chongyang, DONG Ke. Relationship between thrombus elasticity and coagulation function in patients with acute cerebral infarction [J]. Hainan Medical Journal, 2020, 31(15):1923-1926.
- [11] AJČEVIĆ M, FURLANIS G, MILADINOVIĆ A, et al. Early EEG alterations correlate with CTP hypoperfused volumes and neurological deficit: a wireless EEG study in Hyper-Acute ischemic stroke[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2021, 49(9): 2150-2158.
- [12] SANGARI A, AKHOUNZADEH K, VAHEDIAN M, et al. Effect of pre-hospital notification on delays and neurological outcomes in acute ischemic stroke[J]. Australasian Emergency Care, 2022, 25(2): 172-175.
- [13] 陈霏, 王碧. 血清 PDGF 及 SDF-1 水平与急性脑梗死患者脑侧支循环建立的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(1):82-85.
CHEN Fei, WANG Bi. Study on the correlation between levels of PDGF and SDF-1 in serum and the establishment of cerebral collateral circulation in patients with acute cerebral infarction [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(1):82-85.
- [14] LI Shuang, CAO Yuze, ZHANG Huixue, et al. Construction of lncRNA-Mediated ceRNA network for investigating immune pathogenesis of ischemic stroke[J]. Molecular Neurobiology, 2021, 58(9): 4758-4769.
- [15] LI Ping, DUAN Shuyuan, FU Adan. Long noncoding RNA NEAT1 correlates with higher disease risk, worse disease condition, decreased miR-124 and miR-125a and predicts poor recurrence-free survival of acute ischemic stroke[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2020, 34(2): e23056.
- [16] JIN Fa, OU Weiyang, WEI Boyang, et al. Transcriptome-wide analysis to identify the inflammatory role of lncRNA NEAT1 in experimental ischemic stroke[J]. Journal of Inflammation Research, 2021, 14: 2667-2680.
- [17] SHEN Shouyin, MA Liang, SHAO Feng, et al. Long non-coding RNA (lncRNA) NEAT1 aggravates cerebral ischemia-reperfusion injury by suppressing the inhibitory effect of miR-214 on PTEN[J]. Medical Science Monitor, 2020, 26: e924781.
- [18] BAO Yi, LI Sijing, DING Yayong, et al. MiRNA: a potential target for gene diagnosis and treatment of atherosclerotic stroke[J]. The International Journal of Neuroscience, 2021, 131(3): 283-288.

收稿日期: 2022-06-27

修回日期: 2022-08-25

(上接第 93 页)

- [18] PENTON A L, LEONARD L D, SPINNER N B. Notch signaling in human development and disease[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2012, 23(4): 450-457.
- [19] 霍瑞清, 白瑞霞. 人 CyclinD1 在毕赤酵母中的表达 [J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(5):81-83, 87.
HUO Ruiqing, BAI Ruixia. Expression of human CyclinD1 in pichia pastoris [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine. 2016, 31 (5): 81-83, 87
- [20] COHEN B, SHIMIZU M, IZRAILIT J, et al. Cyclin D1 is a direct target of JAG1-mediated Notch signaling in breast cancer[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2010, 123(1): 113-124.
- [21] LIN Fengxia, YANG Yiyang, WEI Shanyin, et al. Hydrogen sulfide protects against high glucose-induced human umbilical vein endothelial cell injury through activating PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 621-633.

收稿日期: 2021-11-18

修回日期: 2022-04-28