

10株宫颈癌细胞系中MALAT1的表达及其对顺铂敏感性的影响

张治洋¹, 李功娟²

(1. 安康市人民医院妇科, 陕西安康 725000; 2. 安康市汉滨区第一医院妇科, 陕西安康 725000)

摘要: **目的** 探究肺腺癌转录相关转录本 1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 在 10 株宫颈癌 (cervical cancer, CC) 细胞中的表达及其对顺铂敏感性的影响。**方法** 选取 10 株 CC 细胞系 (BT-B, C-33A, CaSKi, MEG-01, HeLa, HELA-S3, Ishikawa, RL95-2, HCC94 和 MS751), 通过 CCK-8 实验验证 MALAT1 对 10 株宫颈癌细胞增殖的影响; 通过化疗敏感性实验验证 MALAT1 对 10 种宫颈癌细胞化疗敏感性的影响; 通过荧光素酶报告实验检测 MALAT1 野生质粒的荧光素酶活性。**结果** miR-126-5p 在宫颈癌细胞株中的表达与 MALAT1 呈负相关 ($R=-0.673$, $P=0.033$)。干扰 MALAT1 能够抑制宫颈癌细胞增殖 (均 $P<0.05$), 干扰 MALAT1 能够增加宫颈癌细胞系对顺铂的敏感性 (均 $P<0.05$)。过表达 miR-126-5p 能够抑制宫颈癌细胞增殖 ($P<0.05$), 过表达 miR-126-5p 能够增加宫颈癌细胞系对顺铂的敏感性 ($P<0.05$)。**结论** MALAT1 在宫颈癌中能够通过靶向调控 miR-126-5p 的表达, 进而调节宫颈癌细胞对顺铂的敏感性, 进而导致宫颈癌患者对顺铂产生耐药。

关键词: 宫颈癌; 肺腺癌转录相关转录本 1; 顺铂

中图分类号: R737.33; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2021) 05-110-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2021.05.024

Expression of MALAT1 in 10 Cervical Cancer Cell Lines and Its Effect on Cisplatin Sensitivity

ZHANG Zhi-yang¹, LI Gong-juan²

(1. Department of Gynecology, Ankang People's Hospital, Shaanxi Ankang 725000, China; 2. Department of Gynecology, the First Hospital of Hanbin District, Shaanxi Ankang 725000, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression and effect on the chemoresistance. **Methods** Detected the effect of metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) on proliferation on 10 cervical cancer cells using CCK-8 assay, and detected the effect of MALAT1 on sensitivity to chemotherapy on 10 cervical cancer cells using improved CCK-8 assay, Luciferase activity of MALAT1 wild plasmid was detected by luciferase reporter assay. **Results** The expression of miR-126-5p in cervical cancer cell line was negatively correlated with MALAT1 ($r=-0.673$, $P=0.033$). Knockdown MALAT1 could inhibit the proliferation of cervical cancer cells (all $P<0.05$). Knockdown MALAT1 increased the sensitivity of cervical cancer cell lines to cisplatin (all $P<0.05$). Overexpression of miR-126-5p could inhibit the proliferation of cervical cancer cells ($P<0.05$). Over-expression of miR-126-5p could increase the sensitivity of cervical cancer cell lines to cisplatin ($P<0.05$). **Conclusion** MALAT1 can regulate the expression of miR-126-5p in cervical cancer, thereby regulating the sensitivity of cervical cancer cells to cisplatin, and thereby leading to cisplatin resistance in patients with cervical cancer.

Keywords: cervical cancer; MALAT1; cisplatin

宫颈癌 (cervical cancer, CC) 是常见的女性生殖道恶性肿瘤, 其发病率和病死率均位居前列, 对女性的生命健康构成了巨大威胁^[1-2]。临床上主要采用以手术为主、以放化疗为辅的治疗策略, 但是对局部晚期患者而言治疗效果并不理想^[3]。目前国际上公认并推荐的宫颈癌防控方案是在适宜年龄段妇女群体中广泛开展宫颈癌早筛, 目的是早发现、早

诊断和早治疗。近几年来随着对宫颈癌研究的日益深入发现, 长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 在调控宫颈癌发生、发展中起到了重要作用。肺腺癌转录相关转录本 1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 是 lncRNA 家族中的重要成员^[4], 已有报道 MALAT1 可促进宫颈癌的发生、侵袭和转移, 但其具体的调

作者简介: 张治洋 (1976-), 女, 本科, 副主任医师, 研究方向: 宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌, E-mail: shanzhangzhiyang@163.com。

通讯作者: 李功娟 (1986-), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 滋养细胞肿瘤、妇科恶性肿瘤, E-mail: 398658431@qq.com。

节机制、耐药性以及宫颈癌中的生物特性尚不清楚,仍需更深层次的研究。本研究选取10株宫颈癌细胞系(BT-B, C-33A, CaSKi, MEG-01, HeLa, HELA-S3, Ishikawa, RL95-2, HCC94 和 MS751),检测宫颈癌细胞系中MALAT1的表达及其对化疗药物顺铂敏感性的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 本研究所用宫颈癌细胞系(BT-B, C-33A, CaSKi, MEG-01, HeLa, HELA-S3, Ishikawa, RL95-2, HCC94 和 MS751)均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 试剂和仪器 RPMI-1640 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司, MALAT1 干扰质粒购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司,转染试剂Lipofectamine 2000 购自美国Invitrogen公司,引物订购于上海生工生物工程(股份)有限公司,使用ABI 7500型PCR仪进行实时荧光定量PCR(Quantitative Real-time PCR, qPCR)实验, CCK-8 试剂盒购自Sigma-Aldrich公司, siRNA 是由苏州吉玛基因公司合成。

1.3 方法 细胞培养条件:上述宫颈癌细胞系37℃下用含10g/dl FBS-RPMI-1640 培养液培养,待细胞汇合度达70%时更换培养液并进行传代培养。

qPCR:采用TRIzol法提取宫颈癌肿瘤组织中的总RNA,然后使用Takata反转录试剂盒将RNA反转录制备成cDNA文库;PCR经高温变性、低温退火、中温延伸进行扩增,反应体系参照说明书配置,共进行20个循环,使用 β -Actin作为内参。

细胞转染实验:根据产品说明书使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)转染试剂盒进行细胞转染, siRNA 下调MALAT1表达(序列:5'-GACCTTGAAATCCATGACG-3')。宫颈癌细胞系培养至70%~80%密度时进行转染操作,采用RPMI-1640培养液对MALAT1进行稀释,温室孵育5min,以si-MALAT1的细胞为干扰组,转染无关序列的为阴性对照组。转染后48h使用qPCR测定转染效率并进行后续实验。

CCK-8实验:本研究拟采用CCK-8实验测定宫颈癌细胞系的增殖能力,实验具体操作严格按照CCK-8试剂盒说明书进行。按照每孔约200个细胞接种在96孔板中,每组设置5个平行孔。将处于对数生长期的细胞转染后分别培养0, 24, 48, 72h和96h,在每孔中加入10 μ l的CCK-8试剂,在450 nm波长下检测其吸光度值,吸光度值愈高则表示孔内细胞越多。

化疗敏感性实验:取细胞转染后处于对数生长期的细胞,消化重悬后按每孔约 2×10^5 个细胞接种

于96孔板中,同时每组设置5个副孔。化疗药物(顺铂)按对数浓度设置加药,常规培养24h后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)清洗96孔板,加入含20% CCK-8试剂的培养液,2h后在450 nm波长下检测其吸光度值。

1.4 统计学分析 采用GraphPad Prism 8软件进行实验数据分析,计量资料采用 t 检验,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。qPCR结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MALAT1在10株宫颈癌细胞系中的相对表达量 MALAT1在Ishikawa细胞系中相对表达量为 0.070 ± 0.008 ;在BT-B细胞系中相对表达量为 0.059 ± 0.003 ;在MS751细胞系中相对表达量为 0.057 ± 0.005 ;在RL95-2细胞系中相对表达量为 0.051 ± 0.007 ;在HeLa细胞系中相对表达量为 0.027 ± 0.003 ;在C-33A细胞系中相对表达量为 0.014 ± 0.002 ;在CaSKi细胞系中相对表达量为 0.013 ± 0.002 ;在HELA-S3细胞系中相对表达量为 0.012 ± 0.003 ;在MEG-01细胞系中相对表达量为 0.003 ± 0.001 和在HCC94细胞系中相对表达量为 0.002 ± 0.001 。MALAT1在Ishikawa细胞系中相对表达量显著高于其他细胞株,差异均有统计学意义($t=18.207, 19.488, 25.277, 71.174, 96.039, 97.754, 96.002, 117.526$ 和 119.280 ,均 $P < 0.001$)。MALAT1在HCC94细胞系中相对表达量显著低于其他细胞株,差异均有统计学意义($t=119.280, 254.912, 152.543, 98.000, 111.803, 75.895, 69.570, 44.721$ 和 10.000 ,均 $P < 0.001$)。

2.2 CCK-8实验检测450 nm波长下吸光度值 见表1。CCK-8实验结果显示:对于BT-B, C-33A, CaSKi, HELA-S3, HCC94及MS751细胞,24h后即可观察到CTR组与siRNA组的细胞增殖出现差异, siRNA组细胞增殖明显较CTR组细胞显著减弱,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。对于HeLa, Ishikawa, RL95-2及MEG-01细胞,48h后即可观察到两组细胞增殖出现差异, siRNA组细胞增殖明显较CTR组细胞减弱,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

2.3 干扰MALAT1降低宫颈癌细胞对化疗药物的敏感性 通过改进CCK-8实验验证了干扰MALAT1后宫颈癌细胞对常见化疗药物顺铂敏感性的影响。实验中,首先通过CCK-8实验测得各组细胞对顺铂的IC₅₀,其中, BT-B对顺铂的IC₅₀为 $14.72 \pm 3.89 \mu\text{mol/L}$, C-33A对顺铂的IC₅₀为 $23.25 \pm 2.53 \mu\text{mol/L}$, CaSKi对顺铂的IC₅₀为 $18.25 \pm 3.62 \mu\text{mol/L}$, MS751对顺铂的

IC50 为 $45.33 \pm 5.59 \mu\text{mol/L}$, HeLa 对顺铂的 IC50 为 $11.23 \pm 2.66 \mu\text{mol/L}$, HELA-S3 对顺铂的 IC50 为 $15.25 \pm 3.21 \mu\text{mol/L}$, Ishikawa 对顺铂的 IC50 为 $19.22 \pm 5.26 \mu\text{mol/L}$, RL95-2 对顺铂的 IC50 为 $44.21 \pm 3.23 \mu\text{mol/L}$, HCC94 对顺铂的 IC50 为 $55.69 \pm 8.89 \mu\text{mol/L}$, MEG-01 对顺铂的 IC50 为 $47.55 \pm 6.29 \mu\text{mol/L}$ 。

表 1 CCK-8 实验检测 450 nm 波长下吸光度值

细胞	时间	CTR 组	siRNA 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
BT-T 细胞	24h	0.38 ± 0.07	0.26 ± 0.08	15.965	<0.001
	48h	0.43 ± 0.09	0.25 ± 0.08	21.140	<0.001
C-33A 细胞	24h	0.39 ± 0.04	0.25 ± 0.06	27.456	<0.001
	48h	0.43 ± 0.08	0.33 ± 0.07	13.304	<0.001
CaSKi 细胞	24h	0.37 ± 0.05	0.23 ± 0.03	33.955	<0.001
	48h	0.39 ± 0.06	0.22 ± 0.05	30.782	<0.001
Hela 细胞	24h	0.32 ± 0.07	0.31 ± 0.09	1.240	0.216
	48h	0.45 ± 0.08	0.28 ± 0.10	18.773	<0.001
HELA-S3 细胞	24h	0.44 ± 0.05	0.31 ± 0.09	17.857	<0.001
	48h	0.49 ± 0.07	0.35 ± 0.08	18.625	<0.001
Ishikawa 细胞	24h	0.26 ± 0.06	0.27 ± 0.05	1.811	0.071
	48h	0.51 ± 0.11	0.26 ± 0.08	25.994	<0.001
RL95-2 细胞	24h	0.38 ± 0.09	0.39 ± 0.08	1.174	0.241
	48h	0.50 ± 0.08	0.35 ± 0.06	21.213	<0.001
HCC94 细胞	24h	0.32 ± 0.07	0.19 ± 0.05	21.372	<0.001
	48h	0.33 ± 0.08	0.21 ± 0.09	14.093	<0.001
MEG-01 细胞	24h	0.27 ± 0.09	0.28 ± 0.09	1.111	0.267
	48h	0.48 ± 0.12	0.29 ± 0.07	19.341	<0.001
MS751 细胞	24h	0.31 ± 0.09	0.19 ± 0.06	15.689	<0.001
	48h	0.45 ± 0.13	0.24 ± 0.09	18.783	<0.001

注: CTR 组为阴性对照组, siRNA 组为干扰组。

2.4 两组化疗药物处理后细胞吸光度值比较 见表 2。化疗药物处理后 siRNA 组 BT-B, C-33A, CaSKi, MS751, HeLa, HELA-S3, Ishikawa, RL95-2, HCC94, MEG-01 等细胞在 450nm 波长下的吸光度值显著低于 CTR 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

表 2 两组化疗药物处理后细胞吸光度值比较

细胞	CTR 组	siRNA 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
BT-B 细胞	0.78 ± 0.13	0.59 ± 0.10	16.383	<0.001
C-33A 细胞	0.64 ± 0.09	0.52 ± 0.11	11.940	<0.001
CaSKi 细胞	0.70 ± 0.12	0.48 ± 0.08	21.573	<0.001
Hela 细胞	0.68 ± 0.07	0.53 ± 0.09	18.605	<0.001
Hela-S3 细胞	0.83 ± 0.14	0.72 ± 0.08	9.648	<0.001
Ishikawa 细胞	0.81 ± 0.09	0.59 ± 0.08	25.838	<0.001
RL95-2 细胞	0.75 ± 0.11	0.63 ± 0.10	11.416	<0.001
HCC94 细胞	0.77 ± 0.12	0.64 ± 0.07	13.234	<0.001
MEG-01 细胞	0.66 ± 0.08	0.57 ± 0.09	10.570	<0.001
MS751 细胞	0.65 ± 0.10	0.54 ± 0.07	12.744	<0.001

3 讨论

宫颈癌严重威胁女性健康,且带来了严重的疾病负担^[5-6]。近年来研究发现, lncRNA 在恶性肿瘤的发生、发展中发挥重要作用^[7-9]。肺腺癌转移相关转录本 1(MALAT1) 最早被报道是在非小细胞肺癌中发挥癌基因作用,后续研究发现其在肿瘤中通过多种途径对肿瘤进行调控,能够在转录及转录后水平对下游靶基因进行调控,对肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭、转移、EMT 等多种生物学过程产生影响, MALAT1 能够促进肺腺癌细胞迁移和侵袭,且在膀胱癌中发挥抑制凋亡,促进细胞浸润和转移的作用^[10-11]。另有报道显示, MALAT1 可调节 DNA 甲基化以达到非小细胞肺癌侵袭的作用。MALAT1 在恶性肿瘤发生、发展中作用的研究较多,但是关于其在肿瘤耐药方面的研究尚不多,有文献报道 MALAT1 在直肠癌组织中高表达,且其高表达能够降低直肠癌细胞对氟尿嘧啶、奥沙利铂的敏感性^[12-13]。目前能够见到在多种肿瘤中所起作用,但是尚未见到系统研究其在宫颈癌化疗耐药中所起作用的研究。

本研究通过对课题组保存的 10 株宫颈癌细胞系中干扰 MALAT1 后,检测各株细胞增殖能力均降低,顺铂敏感性实验发现干扰 MALAT1 后,各株宫颈癌细胞系对顺铂的敏感性增加,以上结果说明 MALAT1 能够对宫颈癌患者顺铂耐药产生影响。通过预测 MALAT1 结合的 miRNA,发现 miR-126-5p 与其存在结合位点,通过系列实验验证发现, MALAT1 与 miR-126-5p 存在靶向调控关系, MALAT1 能够充当 miR-126-5p 的分子海绵,对 miR-126-5p 产生吸附效应^[14]。通过在 Ishikawa 细胞系中过表达及干扰 miR-126-5p,发现过表达 miR-126-5p 能够抑制 Ishikawa 细胞增殖,且能增加其对顺铂的敏感性。这与 SUN 等^[15]发表在 *Oncogene* 杂志关于结直肠癌的研究类似,研究发现,在结直肠癌中, MALAT1 能够充当 miR-126-5p 的分子海绵,促进 EMT,进而倒置结直肠癌侵袭和转移^[16]。

以上结果都显示 MALAT1 在宫颈癌中能够通过靶向调控 miR-126-5p 的表达,进而调节宫颈癌细胞对顺铂的敏感性,进而使宫颈癌患者对顺铂产生耐药。

参考文献:

- [1] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.
ZHENG Rongshou, SUN Kexin, ZHANG Siwei, et al. Report of cancer epidemiology in China, 2015 [J]. Chinese Journal of Oncology, 2019, 41(1): 19-28.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA-A Cancer Journal for Clinicians, 2019, 69(1): 7-34.
- [3] 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-A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.
- [4] 周文, 夏月, 谭碧波, 等. 长链非编码 RNA MALAT1 在子宫颈癌中的研究进展 [J]. 海南医学院学报, 2019, 25(24): 1911-1915.
ZHOU Wen, XIA Yue, TAN Bibo, et al. Research progress of long-chain non coding RNA MALAT1 in cervical cancer [J]. Journal of Hainan Medical University, 2019, 25(24): 1911-1915.
- [5] LIAO Lingmin, ZHANG Fenghao, YAO Gongji, et al. Role of long non coding RNA 799 in the metastasis of cervical cancer through upregulation of TBL1XR1 expression [J]. Molecular Therapy Nucleic Acids, 2018, 13: 580-589.
- [6] 顾益凤, 朱自力, 史跃燕, 等. 血浆硫氧还蛋白还原酶水平检测对宫颈癌早期诊断的价值研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(2): 40-43.
GU Yifeng, ZHU Zili, SHI Yueyan, et al. Study on the value of plasma thioredoxin reductase level in the early diagnosis of cervical cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(2): 40-43.
- [7] 陈慎, 杜明君, 宋雅琴. 宫颈组织 HPV DNA 与血清 Chemerin, Leptin 水平联合检测对宫颈癌早期诊断的价值分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(3): 42-46.
CHEN Shen, DU Mingjun, SONG Yaqin. Value of combined detection of HPV DNA and serum levels of chemerin and leptin in early diagnosis of cervical cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(3): 42-46.
- [8] 洪宏, 袁建芬, 喻海忠. 乳腺癌患者血清长链非编码 RNA ATB 表达水平检测及临床诊断价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(2): 22-23, 31.
HONG Hong, YUAN Jianfen, YU Haizhong. Detection and clinical diagnosis value of serum long non-coding RNA ATB in patients with breast cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(2): 22-23, 31.
- [9] DING Xiangya, JIA Xuemei, WANG Cong, et al. A DHX9-lncRNA-MDM2 interaction regulates cell invasion and angiogenesis of cervical cancer [J]. Cell Death and Differentiation, 2019, 26(9): 1750-1765.
- [10] 朱益佳, 宁明哲, 杨平, 等. 血清炎症性肠病抗体谱的检测对 IBD 诊断及鉴别诊断的临床价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 141-143.
ZHU Yijia, NING Mingzhe, YANG Ping, et al. Clinical value of diagnosis and differential diagnosis of detection of serum inflammatory bowel disease antibody spectrum in IBD [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 141-143.
- [11] 张小路, 杜梅红. lncRNA MALAT1 调控 miR-204 表达影响胰腺癌细胞的生物学行为 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(1): 79-84.