

miRNA-195 靶向调控 CCND2 和 MYB 抑制宫颈癌细胞增殖、迁移的机制研究

郝艳芳, 刘亚荣, 黄玲玲, 张 源 (河北北方学院附属第一医院妇科, 河北张家口 075000)

摘要: 目的 研究 miRNA-195 在宫颈癌组织和细胞中的表达, 分析其对宫颈癌细胞增殖、迁移的影响和作用机制。方法 检测 35 例临床宫颈癌组织及其对应癌旁正常组织中 miRNA-195, 通过 Kaplan-Meier Plotter 数据库分析其与宫颈癌患者预后的关系; 采用细胞增殖实验和划痕迁移实验验证 miRNA-195 对宫颈癌 SiHa, HeLa 细胞增殖、迁移的影响; 通过 microRNA 数据库预测 miRNA-195 的靶基因, 双荧光素酶基因实验验证靶向结合关系; qRT-PCR 验证 miRNA-195 对靶基因的调控; 分析宫颈癌中靶基因的表达作用及与 miRNA-195 的相关性, 通过细胞回补实验验证 miRNA-195 是否通过靶向调控蛋白表达在宫颈癌中发挥功能。结果 宫颈癌组织中 miRNA-195 相对表达低于癌旁正常组织 (21.03 ± 5.17 vs 40.67 ± 7.92), 差异有统计学意义 ($t=12.285$, $P<0.001$), 且具有低表达预后差的临床特征 (Logrank $P=0.032$)。过表达 miRNA-195 抑制了宫颈癌细胞的增殖 ($t=6.725\sim 21.433$, 均 $P<0.01$) 和迁移速率 ($t=12.443$, 16.749 , 均 $P<0.001$)。CCND2 和 MYB 是 miRNA-195 的靶基因, 过表达 miRNA-195 显著抑制了 CCND2 和 MYB mRNA 的蛋白表达 ($P<0.01$)。宫颈癌组织中 CCND2 较癌旁正常组织显著高表达 (52.67 ± 4.79 vs 39.86 ± 6.39), 差异有统计学意义 ($t=12.453$, $P<0.001$); MYB 较癌旁正常组织显著高表达 (43.06 ± 6.43 vs 22.07 ± 6.85), 差异有统计学意义 ($t=13.217$, $P<0.001$); 且分别与 miRNA-195 表达呈负相关 ($r=-0.726$, -0.592 , 均 $P<0.05$)。过表达 CCND2 和 MYB 显著促进了宫颈癌细胞的增殖和迁移速率, 敲低 CCND2 和 MYB 表达则得到与之相反的结果 ($F=144.947$, 875.160 , 均 $P<0.001$); 在过表达 miRNA-195 细胞中分别回补过表达 CCND2 和 MYB 后细胞增殖、迁移速率基本回归到正常水平。结论 miRNA-195 可通过靶向调控 CCND2 和 MYB 表达抑制宫颈癌细胞的增殖和迁移, 进而参与宫颈癌的发生发展。关键词: 微小核糖核酸 -195; 细胞周期素 D2 重组蛋白 2; MYB; 宫颈癌; 增殖; 迁移
中图分类号: R737.33; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 01-130-07
doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.01.026

Study on the Mechanism of miRNA-195 Targeting CCND2 and MYB to Inhibit the Proliferation and Migration of Cervical Cancer Cells

HAO Yan-fang, LIU Ya-rong, HUANG Ling-ling, ZHANG Yuan

(Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: Objective By detecting the expression of miRNA-195 in cervical cancer tissues, the effect and mechanism of miRNA-195 on the proliferation and migration of cervical cancer cells were explored. **Methods** The miRNA-195 in 35 clinical cervical cancer tissues and corresponding adjacent normal tissues were detected, and the relationship between stage and prognosis of cervical cancer patients was analyzed by Kaplan-Meier Plotter database. Cell proliferation assay and scratch migration assay were used to verify the effects of miRNA-195 on the proliferation and migration of cervical cancer SiHa and HeLa cells. The target genes of miRNA-195 were predicted by microRNA database, and the targeted binding relationship was verified by double luciferase gene assay. The regulation of miRNA-195 on target genes was verified by qRT-PCR assay. The expression of target genes in cervical cancer and their correlation with miRNA-195 were analyzed. Cell complement assay was used to verify whether miRNA-195 plays a role in cervical cancer by targeting protein expression regulation. **Results** The relative expression of miRNA-195 in cervical cancer tissues was lower than that in adjacent normal tissues (21.03 ± 5.17 vs 40.67 ± 7.92), the difference was statistically significance ($t=12.285$, $P<0.001$), and had the clinical characteristics of low expression and poor prognosis (Logrank $P=0.032$). Overexpression of miRNA-195 inhibited proliferation ($t=6.725\sim 21.433$, all $P<0.01$) and migration rate ($t=12.443$, 16.749 , $P<0.001$) of cervical cancer cells. CCND2 and MYB were target genes of miRNA-195, and the mRNA and protein expressions of CCND2 and MYB were significantly inhibited by overexpression of miRNA-195 ($P<0.01$). CCND2 was significantly higher in cervical cancer tissues than in adjacent normal tissues (52.67 ± 4.79 vs 39.86 ± 6.39), the difference was statistically significance ($t=12.453$, $P<0.001$). The expression of MYB was significantly higher than that of adjacent

基金项目: 河北省医药卫生科技发展计划项目 (2019 WS 317)。

作者简介: 郝艳芳 (1985-), 女, 本科, 医师, 研究方向: 妇科肿瘤临床和基础研究, E-mail: lu8weye36@163.com。

normal tissues (43.06 ± 6.43 vs 22.07 ± 6.85), the difference was statistically significance ($t=13.217$, $P<0.001$). The expression of miRNA-195 was negatively correlated with miRNA-195 expression ($r=-0.726$, -0.592 , all $P<0.05$). Overexpression of CCND2 and MYB significantly promoted the proliferation and migration rate of cervical cancer cells, while knockdown expression of CCND2 and MYB showed opposite results ($F=144.947$, 875.160 , all $P<0.001$). After the overexpression of CCND2 and MYB in the overexpressing miRNA-195 cells, the cell proliferation and migration rate basically returned to the normal level.

Conclusion In cervical cancer, miRNA-195 can inhibit the proliferation and migration of cancer cells by targeting CCND2 and MYB expression, and participate in the occurrence and development of cervical cancer.

Keywords: miRNA-195; CCND2; MYB; cervical cancer; proliferation; migration

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤, 发病率位居女性肿瘤第二位, 死亡率较高, 据报道全世界每年约有30万人死于宫颈癌, 严重威胁女性生命健康^[1-2]。近年研究表明, 癌症的发生发展是一个受许多因素调节的极其复杂的多阶段过程, 其中非编码微小RNA (miRNA) 在包括宫颈癌在内的多种人类恶性肿瘤中异常表达, 参与肿瘤的发生及恶性进展^[3-4]。例如在宫颈癌中, miRNA29a通过调节p16甲基化来抑制细胞增殖和抑制细胞周期^[5]。microRNA-106b在宫颈癌组织中显著高表达, 可促进肿瘤组织的发生、发展^[6]。miRNA-211通过下调抑制蛋白诱导宫颈癌SiHa细胞凋亡^[7]。microRNA-150通过靶向RUNX2使骨肉瘤对阿霉素诱导的细胞凋亡产生敏化作用^[8], 为宫颈癌的研究治疗提供了新方向。miRNA-195是位于人类17号染色体的miRNA, 最早被发现证实存在于小鼠肺组织中呈特异性高表达, 此后在人类细胞组织中也发现了同源miRNA-195^[9]。研究在肝癌、结直肠癌、非小细胞肺癌及宫颈癌等恶性肿瘤中也检测到miRNA-195表达下调, 其扮演抑制基因参与调控肿瘤细胞的各种生物学过程, 并证实与肿瘤病理特征关系显著, 是重要的预后生物标志物^[10-12]。然而miRNA-195在宫颈癌中发挥作用的机制尚未明确, 因此研究拟探究miRNA-195在宫颈癌中的表达及其发挥功能的潜在作用机制, 以期为临床研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 研究对象 人宫颈癌SiHa, HeLa细胞购于美国ATCC细胞库, 培养在含10ml/dl胎牛血清的DMEM培养液中, 加入100 μ g/ml链霉素和100 IU/ml青霉素; 细胞培养瓶置于含5ml/dl CO₂和95%湿度的37℃培养箱中。选取2018年1月~2020年12月期间河北北方学院附属第一医院病理科留存的35例宫颈癌患者的癌组织及对应癌旁正常组织标本, 所有组织均于术中获取, 经病理确认后制成组织标本低温保存备用, 采用qRT-PCR检测基因表达。

1.2 试剂及仪器 胎牛血清、DMEM培养液购自美国Hyclone公司; 链霉素、青霉素购自武汉卡诺斯科技有限公司; MTS反应液购自北京百奥莱博科技有限公司; 酶标仪、荧光定量PCR仪购自美

国ABI公司; 双荧光酶报告系统载体质粒、miR-195 mimics和阴性对照NC-mimics购于南京科佰生物科技有限公司; 慢病毒转染CCND2和MYB质粒, CCND2和MYB干扰siRNA由上海生物制药吉玛有限公司合成; Lipofectamine 2000, Trizol购自美国Invitrogen公司; 逆转录试剂盒购自美国Qiagen公司; 免疫蛋白印记所需试剂购自美国Sigma公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染及分组: 当生长密度达到80%左右, 参照Lipofectamine 2000说明书进行细胞转染, 5ml/dl CO₂, 37℃, 95%湿度条件下常规培养2天。细胞转染分组: 转染miRNA-195 mimics细胞作为miRNA-195过表达组(miRNA-195组); 转染阴性对照NC-mimics细胞作为阴性对照组(NC组); 转染CCND2和MYB慢病毒质粒细胞作为过表达CCND2组和MYB组; 转染CCND2和MYB干扰siRNA细胞作为si-CCND2组和si-MYB组; 同时设置空白对照组(Blank组)。

1.3.2 实时荧光定量PCR实验(qRT-PCR): 使用primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)设计特异性qPCR引物; 将反转录好的cDNA用灭菌纯水稀释20倍, 按照qPCR mix 5 μ l, primer 1 μ l, cDNA 4 μ l的配方加入到96孔PCR板中; 贴膜, 以2500 r/min离心1 min, 将样品放入qPCR仪器中进行实验, 反应完成后拷贝数据进行分析。qPCR引物序列如下: miR-195正向: 5'-TACGACGAGAGAAATATTCGC-3', 反向: 5'-ATGATTAGTTACGACACGTAG-3'; 内参U6正向: 5'-GCTTGCGCACGACATATAGTAAGT-3', 反向: 5'-CGCTTGAGCAATTTTCGGTCTGCAT-3'。PCR扩增条件: 95℃ 15 s, 60℃ 10 s, 72℃ 20 s, 循环40次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达。

1.3.3 细胞增殖实验: 将10 cm盘细胞, 重悬于1 ml新鲜培养液中, 用20 μ l可铺1个96孔板的密度铺细胞, 每个实验组需3个生物重复, 铺好所需的实验孔数。在5ml/dl CO₂, 37℃条件下孵育。细胞贴壁后即可转染。48 h后, 开始测量吸光度值(A值)。配制MTS反应液, 按照MTS:培养液=1:20的比例配制反应液。每孔加入100 μ l MTS反应溶液,

37℃继续培养。每隔30min检测一次 A 值。将培养皿置摇床上低速振荡10s以充分溶解结晶物。在490nm处测量各孔的 A 值,绘制细胞增殖曲线。实验重复3次。

1.3.4 划痕迁移实验:10cm盘的1/4铺整个6孔板,待细胞贴壁后分别转染,待细胞长到90%用枪头在盘中央划痕,保证枪头划痕时垂直,PBS清洗,去除划下细胞,加入无胎牛血清培养液,37℃,5ml/dl CO₂培养0,24h后拍照观察并记录。实验重复3次。

1.3.5 双荧光素酶报告基因实验:将宫颈癌细胞接种到6孔培养板中,使其密度为90%。将含有海肾荧光素酶报道质粒的野生型CCND2 3' UTR-wt, MYB 3' UTR-wt和突变型CCND2 3' UTR-mut, MYB 3' UTR-mut转染至细胞中,使用双重荧光素酶测定系统(Promega, Beijing, China)测量荧光素酶活性,根据生产商的说明将其转染48h后根据海肾荧光素酶活性进行标准化。实验重复3次取平均值。

1.3.6 蛋白免疫印迹实验:将细胞进行蛋白定量并制样,准备电泳、电转装置、电泳液以及电转液,装样品加入在凝胶中,100V进行电泳,待蓝色条带跑出即进行电转,100V电转2h,将蛋白膜放在牛奶中封闭1h,4℃孵育一抗过夜,洗膜4次,每次5min,室温孵育二抗1h,洗膜4次,每次5min,暗房显影。

1.3.7 miRNA-195与宫颈癌预后的关系:通过生物信息学网站和Kaplan-Meier Plotter^[13]数据库检索miRNA-195在宫颈癌中的表达及与预后的关系。

1.3.8 microRNA靶标预测:通过microRNA^[14]网站进行预测miRNA-195结合CCND2和MYB的具体位点,从而进行进一步研究。

1.4 统计学分析 采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;多组比较采用one-way ANOVA分析,组间两两比较采用LSD- t 检验;宫颈癌组织及癌旁正常组织中表达比较采用配对 t 检验;Spearman分析CCND2和MYB表达与miRNA-195表达的相关性; $P < 0.05$ 为差异有统

计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-195在宫颈癌中的表达特征 qRT-PCR检测显示,35例临床宫颈癌组织标本中miRNA-195表达较癌旁正常组织显著降低(21.03 ± 5.17 vs 40.67 ± 7.92),差异有统计学意义($t=12.285$, $P < 0.001$)。通过检索生物信息学网站及Kaplan-Meier Plotter数据库发现,宫颈癌中miRNA-195表达下调,具有显著的低表达预后差临床特征(Logrank $P=0.032$),见图1。表明miRNA-195在宫颈癌的发生发展中具有重要作用。

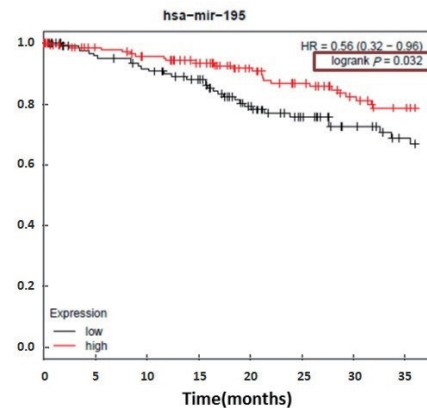


图1 Kaplan-Meier Plotter 数据库检索 miR-195 与宫颈癌预后的关系

2.2 细胞转染效率验证 qRT-PCR检测显示:阴性对照NC组(1.11 ± 0.08)与Blank组(1.09 ± 0.07)miRNA-195相对表达无明显差异($t=0.326$, $P=0.761$),miRNA-195过表达组(1.74 ± 0.15)miRNA-195相对表达较Blank组(1.09 ± 0.07)显著升高($t=6.801$, $P < 0.01$),提示细胞转染效率成功可用于后续实验。

2.3 miRNA-195对宫颈癌细胞增殖、迁移的影响 见表1。细胞增殖实验检测显示,转染第3,4,5天时,miRNA-195组siHa和Hela细胞增殖能力较NC组显著降低,差异均有统计学意义($t=6.725-21.433$, $P < 0.01$)。细胞划痕实验检测见表2。miRNA-195组siHa和Hela细胞迁移速率较NC组显著减慢,差异有统计学意义($t=12.443, 16.749$, 均 $P < 0.001$),提示miRNA-195过表达抑制了宫颈癌细胞的增殖和迁移。

表1 miRNA-195对宫颈癌siHa和Hela细胞增殖 A 值的影响($\bar{x} \pm s$)

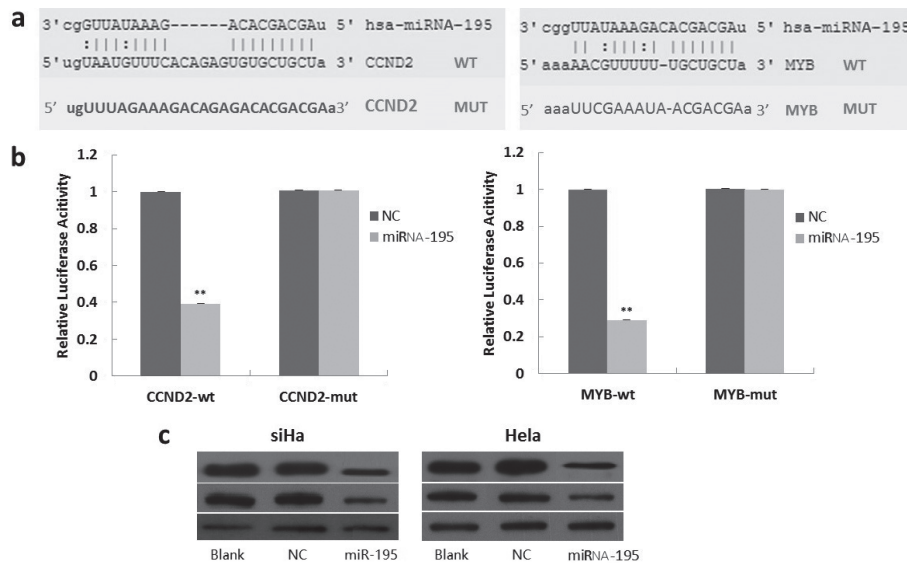
时间	siHa		t	P	Hela		t	P
	NC组	miR-195组			NC组	miR-195组		
第1天	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	1.225	0.288	0.17 ± 0.01	0.15 ± 0.01	2.449	0.070
第2天	0.26 ± 0.04	0.19 ± 0.03	2.425	0.072	0.26 ± 0.03	0.21 ± 0.01	2.739	0.052
第3天	0.45 ± 0.01	0.21 ± 0.02	20.139	< 0.001	0.40 ± 0.02	0.26 ± 0.03	6.725	0.003
第4天	0.61 ± 0.02	0.26 ± 0.02	21.433	< 0.001	0.51 ± 0.02	0.28 ± 0.03	11.049	< 0.001
第5天	0.72 ± 0.05	0.27 ± 0.01	15.286	< 0.001	0.58 ± 0.03	0.29 ± 0.02	13.931	< 0.001

表2 miRNA-195对宫颈癌 siHa 和 HeLa 细胞迁移率的影响 ($\bar{x} \pm s$, %)

细胞	NC 组	miRNA-195 组	<i>t</i>	<i>P</i>
siHa	78.75 ± 1.32	58.63 ± 2.47	12.443	< 0.001
Hela	79.03 ± 2.21	51.59 ± 1.78	16.749	< 0.001

2.4 miRNA-195 靶基因的预测及验证 检索 micro RNA 网站发现, CCND2 和 MYB 的 3'-UTR 区都含有潜在的 miRNA-195 结合序列 (见图 2a)。经双荧光素酶报告基因实验验证发现, miRNA-195 使野

生型 CCND2-wt 和 MYB-wt 荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.01$), 而对突变型 CCND2-mut 和 MYB-mut 荧光素酶活性无显著影响 ($P > 0.05$, 见图 2b), 证实 CCND2 和 MYB 是 miRNA-195 的靶基因。qRT-PCR 和蛋白免疫印迹实验检测发现, miRNA-195 过表达可直接抑制 CCND2 和 MYB 的 mRNA 和蛋白表达 (见图 2c, 表 3), 提示 miRNA-195 可能通过直接结合并抑制 CCND2 和 MYB 表达, 从而在宫颈癌发生发展中发挥功能。



a. microRNA 网站预测 miRNA-195 与 MYB 和 CCND2 结合位点; b. 双荧光素酶报告实验验证 miRNA-195 与 MYB 和 CCND2 的结合关系; c. 过表达 miRNA-195 抑制 MYB 和 CCND2 蛋白表达。

图2 miRNA-195 与 MYB 和 CCND2 结合及调控关系验证

表3 miRNA-195 对 MYB 和 CCND2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	siHa		Hela	
	MYB mRNA	CCND2 mRNA	MYB mRNA	CCND2 mRNA
Blank 组	1.00 ± 0.01	1.01 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.02
NC 组	0.98 ± 0.02	0.97 ± 0.03	0.99 ± 0.01	0.98 ± 0.01
miRNA-195 组	0.32 ± 0.02 [*]	0.27 ± 0.03 [*]	0.29 ± 0.03 [*]	0.31 ± 0.02 [*]
<i>F</i>	947.312	820.421	1035.727	1142.333
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: 与 blank 组或 NC 组相比, ^{*} $P < 0.001$ 。

2.5 CCND2 和 MYB 在宫颈癌组织中的表达及与 miRNA-195 的相关性 qRT-PCR 检测发现, 35 例临床宫颈癌组织 (52.67 ± 4.79) 中 CCND2 表达较癌旁正常组织 (39.86 ± 6.39) 显著高表达 ($t = 12.453$, $P < 0.001$); 同时 MYB 较癌旁正常组织亦显著高表达 (43.06 ± 6.43 vs 22.07 ± 6.85), 差异有统计学意义 ($t = 13.217$, $P < 0.001$); Spearman 相关性分析显示, 宫颈癌组织中 CCND2 和 MYB 表达分别与 miRNA-195 表达呈负相关 ($r = -0.726$, -0.592 , 均 $P < 0.05$)。

2.6 CCND2 和 MYB 表达对宫颈癌细胞增殖、迁移的影响 见表 4。以 HeLa 细胞为例转染慢病毒质粒和干扰 siRNA 分别过表达和敲低 CCND2 和 MYB 表达, 经细胞实验检测发现, 转染培养 5 天后, 过表达 CCND2 和 MYB 明显促进了宫颈癌细胞的增殖和迁移速率, 而敲低 CCND2 和 MYB 表达则得到与之相反的结果 ($F = 144.947 \sim 875.160$, all $P < 0.001$), 由此说明 CCND2 和 MYB 的致癌基因属性。

表4 CCND2 和 MYB 表达对细胞增殖、迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$)

类别	Blank 组	CCND2 组	MYB 组	si-CCND2 组	si-MYB 组	F	P
增殖 A 值	0.56 ± 0.04	0.87 ± 0.05*	0.84 ± 0.07*	0.24 ± 0.02*	0.21 ± 0.03*	144.947	<0.001
迁移率 (%)	81.01 ± 2.15	94.23 ± 3.21*	95.46 ± 2.57*	64.28 ± 1.76*	62.89 ± 2.63*	875.160	<0.001

注: 与 Blank 组相比, * $P < 0.001$ 。

2.7 miRNA-195 靶向调控 CCND2 和 MYB 表达抑制宫颈癌细胞的增殖和迁移 见表 5。研究通过回补实验在过表达 miRNA-195 细胞中分别回补过表达 CCND2 和 MYB, 发现 miRNA-195 对细胞增殖

和迁移速率的抑制作用被逆转, 细胞水平基本回到正常值 ($P > 0.05$), 说明 miRNA-195 可通过直接靶向调控 CCND2 和 MYB 表达在宫颈癌中发挥作用。

表5 miRNA-195 调控 CCND2 和 MYB 对宫颈癌细胞增殖和迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$)

类别	Blank 组	miR-195 组	miR-195+CCND2 组	miR-195+MYB 组	F	P
增殖 A 值	0.56 ± 0.03	0.30 ± 0.02**	0.53 ± 0.02	0.54 ± 0.03	69.038	<0.001
迁移率 (%)	80.13 ± 1.25	58.63 ± 2.47**	79.46 ± 2.91	78.98 ± 3.25	49.159	<0.001

注: 与 Blank 组相比, ** $P < 0.001$ 。

3 讨论

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一, 发病率居高不下, 其早期不易发现, 一经发现往往处于中晚期, 复发、侵袭和转移率较高, 导致患者预后不良。近年研究发现, 宫颈癌的发生发展是一个非常复杂的过程, 涉及从正常宫颈上皮细胞到癌细胞浸润的许多编码和非编码基因的结构和表达异常^[15]。作为单链非编码 RNA, miRNA 通过参与靶基因表达的调控, 在细胞增殖、凋亡、分化和迁移等生物学过程中发挥作用^[3-4]。如 miRNA-6744-5p 在乳腺癌中通过促进 anoikis 并直接靶向 NAT1 酶, 调控细胞的增殖、迁移等行为^[16]。microRNA-198 促进了食管癌的迁移、侵袭和转移^[17]。miRNA-200b-3p 可通过 Wnt1 抑制结肠癌的迁移和侵袭^[18]。表明 miRNAs 在肿瘤发生发展中发挥重要作用, 故探究不同 miRNAs 在宫颈癌中的作用及调节机制极具意义。

近年研究证实, miRNA-195 作为癌症抑制基因在人类多种癌组织中表达下调, 与肿瘤的发生密切相关。如 PARESH 等^[19] 报道, 乳腺癌细胞中 miRNA-195 通过靶向丝裂蛋白-2 调节线粒体功能, 参与调控乳腺癌细胞的增殖、迁移。miRNA-195 通过靶向 WNT3A 抑制结肠癌增殖和转移^[20]。miRNA-195 通过靶向 HMGA1 逆转胃癌细胞 5-FU 耐药^[21]。miRNA-195 通过靶向 SOX4 抑制子宫内膜癌细胞的迁移、侵袭和上皮-间充质转化 (EMT)^[22]。而本研究探究发现 miRNA-195 在宫颈癌组织中显著低表达, 具有低表达预后差特征; 细胞实验证实, 过表达 miRNA-195 显著抑制了宫颈癌细胞的增殖和迁移速率, 表明其低表达在一定程度上参与了宫颈癌的发生发展, 扮演抑癌基因角色。

细胞周期的运行关系细胞的增殖、凋亡和分

化, 是肿瘤发生发展的关键因素之一。研究报道, miRNA-195 通过调控靶基因与细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 决定了细胞在整个细胞周期中的进程^[11]。CCND2 是重要的细胞周期蛋白, 可与 CDK4 或 CDK6 形成复合物, 调控细胞周期 G1 期向 S 期的转化, 参与调控细胞增殖过程^[23]。证实 CCND2 在包括卵巢癌等一系列肿瘤中高表达, 抑制该基因可抑制癌细胞的增殖, 与肿瘤的发生显著相关^[24]。MYB 是广泛存在的直接转录因子, 最初被认为是 v-MYB 的细胞同源物, 后来被表征为几种类型的人类癌症中的转化癌基因, 发现 MYB 在多种癌组织中高表达与患者预后不良有关^[25]。MYB 通过激活靶基因 (例如环氧化酶 2, B 细胞淋巴瘤 2 和 c-MYC) 的转录及调节肿瘤相关转移基因表达可调节细胞周期 G1/S 期转化, 影响多种细胞的增殖、分化和侵袭、转移^[26]。因此本研究进一步探究了宫颈癌中 CCND2 和 MYB 表达与 miRNA-195 之间的作用关系, 首先研究证实宫颈癌组织中 CCND2 和 MYB 显著高表达, 分别与 miRNA-195 表达呈负相关; 通过检索数据库预测发现, miRNA-195 与 CCND2 和 MYB 存在结合位点, 荧光素酶报告基因实验证实 CCND2 和 MYB 是 miRNA-195 的靶基因。相关研究也证实, miRNA-195 可靶向抑制非小细胞肺癌细胞中的 MYB 表达, 并与 MYB mRNA 中的 3' 非翻译区进行结合, 从而调控肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[27]。心肌细胞中, miRNA-195 可通过下调 c-MYC 蛋白的表达水平, 从而参与调节心肌细胞的凋亡; LncRNA ZFAS1 通过 miRNA-195/MYB 轴增强儿童急性髓系白血病阿霉素耐药^[28]。可见, miRNA-195, CCND2 和 MYB 在癌症进程中存在一定的调控关系。为进一步明确 miRNA-195 发挥功能作用的

方式,研究经细胞实验探究发现,过表达 miRNA-195 显著抑制了 CCND2 和 MYB 的表达,过表达 CCND2 和 MYB 则显著促进宫颈癌细胞的增殖和迁移,证实了 CCND2 和 MYB 的致癌基因属性。细胞回补实验证实,回补过表达 CCND2 和 MYB 能够抑制过表达 miRNA-195 对细胞增殖、迁移速率的抑制作用,提示 miRNA-195 可通过调控 CCND2 和 MYB 基因表达发挥功能,参与调节宫颈癌的发生发展。然而 miRNAs 调控肿瘤发生的作用机制及分子信号通路复杂,故 miRNA-195 调控宫颈癌发生的更深入具体作用机制后期还需继续探究阐明。

综上所述,miRNA-195 在宫颈癌组织中低表达,其通过靶向抑制致癌基因 CCND2 和 MYB 的表达从而促进宫颈癌的进程,在宫颈癌的发生发展中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021,71(3):209-249.
- [2] CHEN C P, KUNG P T, WANG Y H, et al. Effect of time interval from diagnosis to treatment for cervical cancer on survival: A nationwide cohort study[J]. PLoS One, 2019,14(9):e0221946.
- [3] 冯磊,常春红,管晓卿,等. 宫颈癌患者血浆 miRNA-10b 的表达及其临床意义[J]. 现代检验医学杂志,2018,33(1):52-55, 58.
FENG Lei, CHANG Chunhong, GUAN Xiaoqing, et al. Expression of plasma miRNA-10b in patients with cervical cancer and its clinical significance [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2018,33(1):52-55, 58.
- [4] GAO Chundi, ZHOU Chao, ZHUANG Jing, et al. MicroRNA expression in cervical cancer: Novel diagnostic and prognostic biomarkers[J]. J Cell Biochem, 2018,119(8):7080-7090.
- [5] WANG Anjin, XU Qiying, SHA Rengaowa, et al. MicroRNA29a inhibits cell proliferation and arrests cell cycle by modulating p16 methylation in cervical cancer[J]. Oncology Letters, 2021,21(4):272.
- [6] 高红敏,杨红英,刘鑫. 血清中 microRNA-106b 对宫颈癌患者的早期诊断及预后预测价值[J]. 现代检验医学杂志,2020,35(6):85-86,182.
GAO Hongmin, YANG Hongying, LIU Xin. Value analysis of serum microRNA-106b in early diagnosis of cervical cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2020,35(6):85-86, 182.
- [7] LIU Y L, WANG G Q, CUI H X, et al. miRNA211 induces apoptosis of cervical cancer SiHa cells via down-regulation of inhibitor of apoptosis proteins[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018,22(2):336-342.
- [8] LING Zhonghua, FAN Gentao, YAO Danhua, et al. MicroRNA-150 functions as a tumor suppressor and sensitizes osteosarcoma to doxorubicin-induced apoptosis by targeting RUNX2[J]. Experimental and Therapeutic Medicine,2020,19(1):481-488.
- [9] 陈小燕,吴陈宾,田昕,等. LncRNA ANRIL 靶向 miRNA-195 对 HCT116 细胞及裸鼠移植瘤放射增敏实验研究[J]. 中华放射肿瘤学杂志,2019,28(11):858-861.
CHEN Xiaoyan, WU Chenbin, TIAN Xin, et al. Inc RNA ANRIL target miR-195 experimental study of radiation sensitivity of HCT116 cells and nude mouse transplanted tumors[J]. Chin J Radiation Oncology,2019,28(11):858-861.
- [10] SHENG Langqing, LI Jiarong, LI Nianfeng, et al. Atractylenolide III predisposes miR-195-5p/FGFR1 signaling axis to exert tumor-suppressive functions in liver cancer[J]. J Food Biochem,2021,45(5):e13582.
- [11] 罗雷,杨彦辉,李季,等. miRNA-195 靶向调控 CHEK1 对非小细胞肺癌细胞增殖、转移及侵袭的作用[J]. 局解手术学杂志,2019,28(4):261-266.
LUO Lei, YANG Yanhui, LI Ji, et al. The effect of miR-195 on the proliferation, metastasis and invasion of non-small cell lung cancer cells by CHEK1 [J]. Journal of Local Soluble Surgery,2019,28(4):261-266.
- [12] POEL D, BOYD N C, BEEKHOF R, et al. Proteomic Analysis of miR-195 and miR-497 replacement reveals potential candidates that increase sensitivity to oxaliplatin in MSI/P53wt colorectal cancer cells[J]. Cells,2019,8(9):1111.
- [13] NAGY Á, LANCZKY Á, MENYHÁR T O, et al. Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1):9227.
- [14] KERN F, KRAMMES L, DANZ K, et al. Validation of human microRNA target pathways enables evaluation of target prediction tools[J]. Nucleic Acids Research, 2020,49(1):127-144.
- [15] LÜ Kangtai, LIU Zhu, FENG Jie, et al. MiR-22-3p regulates cell proliferation and inhibits cell apoptosis through targeting the eIF4EBP3 gene in human cervical squamous carcinoma cells[J]. Int J Med Sci,2018, 15(2):142-152.
- [16] MALAGOBADAN S, HO C S, NAGOOR N H. MicroRNA-6744-5p promotes anoikis in breast cancer and directly targets NAT1 enzyme[J]. Cancer Biol Med, 2020, 17(1):101-111.
- [17] SHI Yijun, FANG Na, LI Yadong, et al. Circular RNA LPAR3 sponges microRNA - 198 to facilitate esophageal cancer migration, invasion, and metastasis[J]. Cancer Science,2020,111(8):2824-2836.
- [18] CHEN Lijuan, WANG Xiangqun, ZHU Yunhua, et al. miR-200b-3p inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer by targeting Wnt1[J]. Molecular Medicine Reports,2018,18(3):2571-2580.
- [19] PUROHIT P K, EDWARDS R, TOKATLIDIS K, et al. MiR-195 regulates mitochondrial function by targeting mitofusin-2 in breast cancer cells[J]. RNA Biology, 2019,16(7):918-929.
- [20] LI Baoyu, WANG Shunsheng, WANG Shumei. MiR-195 suppresses colon cancer proliferation and metastasis by targeting WNT3A[J]. Mol Genet Genomics, 2018,293(5):1245-1253.