

文章编号 1006-8147(2016)04-0288-03

论著

## miR-186 通过靶定 CEA 抑制宫颈癌细胞转移

孙艳, 齐政, 王德华, 张艳芳

(天津医科大学总医院妇产科, 天津 300052)

**摘要** 目的:验证 miR-186 通过靶定癌胚抗原(CEA)对宫颈癌细胞生物功能的影响。方法:利用表达谱芯片及荧光定量 PCR 验证 miR-186 在宫颈癌中的表达水平;通过 Transwell 及划痕试验阐述 miR-186 靶定 CEA 对宫颈癌细胞转移能力的影响;通过双荧光素酶报告基因方法验证 miR-186 对 CEA 的靶定关系。结果:转移性宫颈癌组织中 miR-186 的表达水平较非转移性宫颈癌组织中偏低;在宫颈癌细胞中上调 miR-186 的表达水平并靶定 CEA 能够抑制其转移能力;荧光报告载体试验证实 CEA 为 miR-186 的靶基因。结论:miR-186 抑制宫颈癌的转移,CEA 为 miR-186 的靶基因。

**关键词** miR-186;宫颈癌;癌胚抗原;转移**中图分类号** Q7**文献标志码** A

## miR-186 inhibits cervical cancer migration by targetting CEA

SUN Yan, QI Zheng, WANG De-hua, ZHANG Yan-fang

(Department of Obstetrics and Gynecology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

**Abstract** **Objective:** To analyze the function of miR-186 in cervical cancer by targeting CEA. **Methods:** MicroRNA microarray and qRT-PCR were performed to analyze the expression level of miR-186, then transwell and wound healing assay were performed to analyze the effect of miR-186 over-expression on cervical cell lines. In addition, luciferase reporter assay was used to locate the target gene of miR-186. **Results:** The expression of miR-186 in metastasis cervical cancer was lower than that in non-metastasis cervical cancer tissues. Ectopic expression of miR-186 inhibited cervical cell migration. The result of Luciferase reporter assay showed that CEA was directly regulated by miR-186. **Conclusion:** MiR-186 is lowly expressed in metastasis cervical cancer and inhibited cervical cancer cell migration through targetting CEA.

**Key words** miR-186; cervical cancer; CEA; migration

microRNA (miRNA) 是一类长度约 18~25 碱基的非编码调控型 RNA。miRNA 主要通过作用于靶基因的 3'UTR 区而调控其表达<sup>[1]</sup>。miRNA 在肿瘤的发生及发展过程中发挥着重要的调控作用。大量研究表明,miRNA 在肿瘤的生物学过程中充当着“原癌基因”或“抑癌基因”。例如 miR-21 作为一种研究比较透彻的促癌基因,已经发现在各种肿瘤的发生、发展过程中存在着积极的作用<sup>[2-6]</sup>。此外还有一些 miRNA 在肿瘤细胞中发挥着抑癌基因的作用。例如 miR-34a, miR-132, miR-15, miR-7 等在肿瘤中低表达并参与肿瘤生物功能的调控<sup>[7-11]</sup>。在世界范围内,宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一。尽管早期宫颈癌可以通过手术及化疗进行治疗,但是针对复发转移的宫颈癌并没有有效的治疗手段。因此寻找更好的疗法对宫颈癌的治疗将至关重要。随着 miRNA 的深入研究,其作为肿瘤基因治疗的应用前景逐渐受到人们的关注。本文主要研究 miR-186 对宫颈癌细胞生物功能的影响及其发挥作用的靶基因。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

1.1.1 实验标本 均取自 2012 年 5 月-2014 年 8 月在天津医科大学总医院手术治疗的宫颈癌患者。取肉眼可见宫颈癌组织并立即冻存于液氮中低温保存。

1.1.2 试剂及仪器 Trizol Reagent 购自美国 Sigma 公司, lipofectamine 2000 Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; SYBR® PrimeScript® miRNA RT-PCR Kit 购自大连 Takara 公司; 人宫颈癌细胞株 HeLa 及 C33A 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; T4 DNA 连接酶, 内切酶购自美国 NEB 公司; 寡核苷酸 CEA 基因的 siRNA 购自上海吉玛公司; CEA 一抗购自英国 Abcam; 辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥; OLYMPUS 倒置荧光显微镜 (日本 OLYMPUS)。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌细胞 HeLa 及 C33A 用含 10% 胎牛血清及青链霉素的 RPMI 1640 培养基, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。

作者简介 孙艳(1981-),女,住院医师,硕士,研究方向:妇科肿瘤;通信作者:齐政, E-mail:qizheng@eyou.com。

**1.2.2 RNA的提取** 组织从液氮取出后,加入液氮并研碎,然后加入 Trizol 提取总 RNA。细胞总 RNA 提取:每  $10^7$  细胞加入 1 mL 的 Trizol,充分反应后提取细胞的总 RNA。详细提取步骤可参见 Trizol 说明书。

**1.2.3 miRNA 表达谱芯片** 按 TRIzol 试剂盒说明书进行操作,提取全部 RNA,用 miRNA 基因芯片(北京博奥公司产品)进行 miRNA 微阵列分析。实验简述如下:首先将 miRNA 成熟体 3'端进行 Cy 荧光标记,与芯片杂交后用扫描仪扫描 miRNA 微阵列,然后针对获得的微阵列图像进行分析。

**1.2.4 qRT-PCR** 根据 Takara 公司 SYBR® PrimeScript® miRNA RT-PCR Kit 试剂盒说明书加入 1  $\mu$ g 的 total RNA 及逆转录反应所需试剂。得到的逆转录产物用相应的 PCR 引物在定量 PCR 仪进行实时定量 PCR。PCR 条件为 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 进行 35 个循环;采用 U6 RNA 作为内标。

**1.2.5 载体构建及 siRNA** 根据生物信息学中预测结果得到 miR-186 在 CEA 基因 3'UTR 中的结合位点,将包含有靶位点的 3'UTR 序列及突变型 3'UTR 序列进行全基因合成,然后利用内切酶 *PmeI* 及 *XbaI* 将目的序列加入荧光报告基因载体 pmirGLO。CEA 表达质粒的构建:首先利用 PCR 方法扩增得到 CEA 整个 CDS 区基因片段,然后将其连接到 pcDNA3.1 真核表达载体中。miR-186 的表达质粒构建:首先利用 PCR 方法从 HEK293 细胞中扩增得到 miR-186 高表达的基因组片段,然后将其连接到 pcDNA3.1 真核表达载体中。

**1.2.6 靶基因荧光检测** 将处于对数生长期的 HeLa 及 C33A 细胞接种于 48 孔板,置于 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h 后,将 miR-186 表达质粒单独转染或者与荧光报告载体共转染 HeLa 及 C33A 细胞。转染后 48 h,检测荧光素酶活性。

**1.2.7 Transwell 检测细胞转移** 首先 Transwell 小室下表面涂一层 fibronectin (10  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ L), 37  $^{\circ}$ C 2 h。将小室放入预先加有含 10% 血清培养基的 24 孔板内,然后在 Transwell 的内室加入  $10^5$  细胞。16 h 后,取出 Transwell,擦去 PVDF 膜靠近内室那一面的细胞,另一面的细胞用甲醛室温固定 30 min,结晶紫染色 20 min,用清水洗 3 遍后在显微镜下观察细胞,记数。

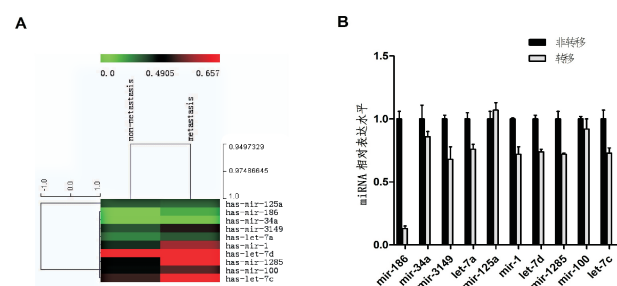
**1.2.8 划痕实验检测细胞迁移** 在空中加入约  $5 \times 10^5$  个细胞,24 h 用枪头垂直划痕。用 PBS 洗细胞 3 次后,加入培养基并放入 37  $^{\circ}$ C 5%  $\text{CO}_2$  培养箱。24 h 取样,拍照。

**1.2.9 Western blot 检测蛋白表达** 转染后 48 h,提取细胞总蛋白并测定蛋白浓度后,各组间取等量蛋

白经 SDS PAGE 分离后,转至 PVDF 膜上。封闭后分别用目的蛋白抗体及内参抗体孵育 4 h。然后与辣根酶标记的二抗进行孵育 1 h,最后进行曝光显影。

## 2 结果

**2.1 miR-186 在转移性宫颈组织中低表达** 将取得的 10 对转移性宫颈癌及非转移性宫颈癌组织提取总 RNA,选择其中一对做 miRNA 表达谱芯片。然后利用 qRT-PCR 检测 10 对组织中 miR-186 的表达水平。芯片及 PCR 结果显示,miR-186 在转移性宫颈癌组织中的表达水平普遍低于其在非转移性宫颈癌组织中的表达水平(图 1)。

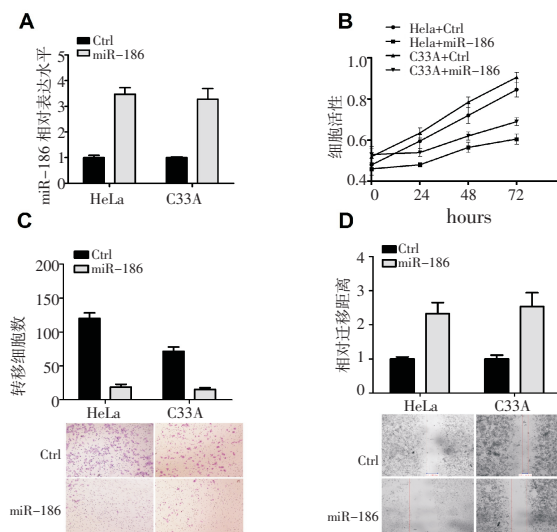


A. 从 miRNA 表达谱芯片结果中筛选出 10 个在转移性宫颈癌组织中低表达的 miRNA。B. 利用荧光定量 PCR 对表达谱芯片的结果进行验证

图 1 miR-186 在转移性宫颈癌中低表达

Fig 1 Low expression of miR-186 in metastatic cervical cancer

**2.2 miR-186 抑制宫颈癌细胞的转移** 将高表达 miR-186 的质粒 pcDNA3.1/miR-186 及其对照载体转染对数生长期的 HeLa 及 C33A 细胞后,利用 Transwell 及划痕实验检测 miR-186 的表达变化对宫颈癌细胞转移能力的影响。结果表明,miR-186 表达的上调能够有效的抑制宫颈癌细胞的转移(图 2)。

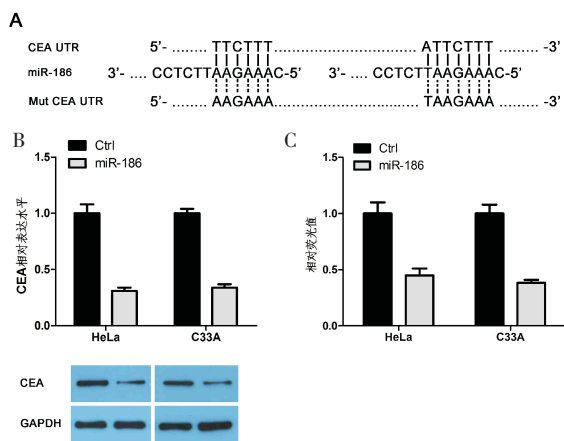


A. 荧光定量 PCR 检测 miR-186 的表达变化。B. MTT 分析 miR-186 对细胞活性的影响。C&D. miR-186 过表达后分别用 Transwell(C)及划痕实验(D)检测细胞的迁移能力

图 2 上调 miR-186 的表达能够抑制宫颈癌细胞的转移

Fig 2 Over-expression of miR-186 inhibits cervical cancer cell invasion

2.3 miR-186 靶定并抑制 CEA 的表达 将 pcDNA3.1/miR-186 及其对照载体与荧光报告质粒共转 HeLa 及 C33A 细胞。通过分析荧光素酶活性后发现,在野生型 CEA 3'UTR 组,miR-186 高表达组的荧光素酶活性比对照组低。而在突变型 CEA 3'UTR 组,miR-186 过表达后荧光素酶活性与对照组相比并没有明显变化。此外,我们对转染 miR-186 及其对照载体的宫颈癌细胞中 CEA 的蛋白表达水平进行了分析。结果显示 miR-186 能够有效的降低 CEA 的蛋白表达。这说明 miR-186 可以直接作用于 CEA 的 3'UTR 区并抑制其蛋白表达(图 3)。



A. 通过靶基因预测网站得到 miR-186 在 CEA 中的作用位点, 并将其突变。B. 过表达 miR-186 后利用 western blot 检测 CEA 蛋白表达变化。C. 利用双荧光素酶报告系统验证 miR-186 与 CEA 的靶定关系

图 3 miR-186 直接抑制 CEA 的表达

Fig 3 miR-186 directly regulates CEA expression

### 3 讨论

随着生活水平的提高,人们越来越重视疾病对身体的影响。在众多疾病中,癌症是我们必须面对的一个强敌,每年因癌症死亡的人不计其数。宫颈癌是一种严重影响女性身心健康的高发性恶性肿瘤。随着科学发展,肿瘤的治疗已经达到了基因水平。而近年来 miRNA 越来越受到人们的关注,这类调控性小分子 RNA 可以通过调控癌基因或抑癌基因的表达来参与肿瘤的生物学过程<sup>[12-14]</sup>。本文通过运用 miRNA 表达谱芯片及荧光定量 PCR,证实了 miR-186 在宫颈癌组织及细胞中呈现低表达。

结果显示利用 miR-186 表达质粒上调其表达能够有效的抑制宫颈癌细胞的转移能力。通过生物信息学预测发现 YES1 的 3'UTR 区包含了一段 miR-186 种子序列结合位点,我们通过靶基因荧光报告试验及 western blot 确认了 miR-186 在 CEA 基因 3'UTR 区的结合位点的负调控关系。该结果提示

miR-186 在宫颈癌细胞中的调控功能与 CEA 基因有着密切的联系。

CEA 是一种在细胞粘附及细胞内信号传导发挥着重要功能的细胞表面糖蛋白<sup>[15-16]</sup>,它是从肿瘤和胚胎组织中提取的一种肿瘤相关抗原,对于肿瘤疾病的诊断、治疗效果的判定和预后都有非常重要的临床意义<sup>[15,17-18]</sup>。大量研究表明 CEA 在多种肿瘤中高表达并参与肿瘤生物功能的调节。本研究再次证实了 CEA 在宫颈癌中的高表达,同时阐述了利用 RNA 干扰降低 CEA 基因表达后对宫颈癌细胞转移能力的负调控。

综上所述,本研究证实了 miR-186 在转移性宫颈癌组织中的低表达,并通过试验验证了 CEA 为 miR-186 的靶基因及其 miR-186 与 CEA 基因表达的负相关性。我们发现 miR-186 对宫颈癌转移的负调控功能是由 CEA 介导的,这可能为宫颈癌的小分子治疗及宫颈癌的诊断提供一定的理论基础。

#### 参考文献:

- [1] Llave C, Xie Z X, Kasschau K D, et al. Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of arabidopsis miRNA[J]. Science, 2002, 297(5589): 2053
- [2] Asangani I A, Rasheed S A, Nikolova D A, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(15): 2128
- [3] Zhang Z Y, Li Z J, Gao C P, et al. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression[J]. Lab Invest, 2008, 88(12): 1358
- [4] Zhang W, Bai W, Zhang W. MiR-21 suppresses the anticancer activities of curcumin by targeting PTEN gene in human non-small cell lung cancer A549 cells[J]. Clin Trans Oncol, 2014, 16(8): 708
- [5] Zhang H, Guo Y, Shang C, et al. miR-21 downregulated TCF21 to inhibit KISS1 in renal cancer[J]. Urology, 2012, 80(6):1298
- [6] Yang Y, Chaerkady R, Beer M A, et al. Identification of miR-21 targets in breast cancer cells using a quantitative proteomic approach[J]. Proteomics, 2009, 9(5): 1374
- [7] Roy S, Levi E, Majumdar A P, et al. Expression of miR-34 is lost in colon cancer which can be re-expressed by a novel agent CDF[J]. J Hematol Oncol, 2012, 5: 58
- [8] Ji Q, Hao X B, Meng Y, et al. Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 266
- [9] Cong Y J, Yang L, Zheng F N, et al. MiR-132 suppresses the migration and invasion of lung cancer cells via targeting the EMT regulator ZEB2[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91827
- [10] Cimmino A, Calin G A, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(39): 13944
- [11] Liu Z L, Jiang Z M, Huang J Y, et al. miR-7 inhibits glioblastoma

(下转第 294 页)

剂量时,可在体模中形成焦域;颅骨厚度较大,由于本实验设备的限制,最大功率只能提高至 300 W,至最大功率经颅辐照时间 5 min 后,仍未有焦域出现。若继续增长辐照时间,骨骼部分区域会产生轻微碳化<sup>[10]</sup>(图 6)。由于仿体组织制作过程中,蛋清液很难与其他溶液完全均匀混合,导致实验结果可重复性较差。

综合上述结果得出结论,单阵元凹球面换能器进行 HIFU 经骨骼聚焦时造成的幅值及相位畸变使聚焦困难,聚焦后焦域声压较纯水中有极大的下降。经厚度较小且结构简单的羊肩胛骨通过增加激励功率及辐照时间来提高聚焦声压后,可以在仿体组织内靶区形成焦域,但其为形状不规则的发散焦域;厚度较大且结构较复杂的人颅骨顶骨区则在实验限制条件下无法形成焦域。辐照时间过长可造成骨骼热损伤。

#### 参考文献:

- [1] 孙武军,张弥左,李文龙,等. 高强度聚焦超声换能器温度场的数值仿真[J]. 生物物理学报,2009,25(5):366
- [2] 王韶林,肖雪刚,陈晓瑞,等. 高强度聚焦超声焦域的实验研究[J]. 中国超声医学杂志,2012,28(5):385
- [3] 于廷和. 超声治癌机制[J]. 国外医学:肿瘤学分册,1997,24(5):301
- [4] 危安,周启昌. HIFU 治疗肝癌疗效评价及超声在评价中的应用价值[Z]. 2006:123
- [5] Labuda C P, Church C C. Augmentation of HIFU-induced heating with fibers embedded in a phantom[J]. Ultrasound Med Biol, 2011, 37(3):442
- [6] 薛凡凡,常诗卉,营喜岐. 血管对高强度聚焦超声焦域影响的体模实验研究[J]. 天津医科大学学报,2014,20(4):275
- [7] Lee K I, Choi M J. Prediction and measurement of the size of thermal lesion induced by high intensity focused ultrasound in a tissue-mimicking phantom[J]. Jpn J Appl Phys, 2009, 48(2):27003
- [8] Wang J C, Shieh J, Chen B T, et al. A study of latent heat effects in temperature profiles and lesion formation[J]. Int J Heat Mass Transf, 2014,71:285
- [9] Tang S C, Clement G T. Standing wave suppression for transcranial ultrasound by random-modulation[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2010, 57(1):203
- [10] Pernot M, Aubry J F, Tanter M, et al. Prediction of the skull overheating during high intensity focused ultrasound transcranial brain therapy[C]//Ultrasonics Symposium, 2004:1005

(2016-01-27 收稿)

.....

(上接第 290 页)

- growth by simultaneously interfering with the PI3K/ATK and Raf/MEK/ERK pathways[J]. Int J Oncol, 2014, 44(5): 1571
- [12] Gougelet A, Sartor C, Bachelot L, et al. Antitumour activity of an inhibitor of miR-34a in liver cancer with  $\beta$ -catenin-mutations[J]. Gut,2016, 65(6):1024
- [13] Montani F, Marzi M J, Dezi F, et al. miR-Test: a blood test for lung cancer early detection[J]. J Natl Cancer Inst, 2015, 107(6): djv063
- [14] Zoni E, Van Der Horst G, Van De Merbel A F, et al. miR-25 modulates invasiveness and dissemination of human prostate cancer cells via regulation of  $\alpha$ (v)- and  $\alpha$ (6)-Integrin expression[J]. Cancer Res, 2015, 75(11): 2326
- [15] Vukobrat-Bijedic Z, Husic-Selimovic A, Sofic A, et al. Cancer antigens (CEA and CA 19-9) as markers of advanced stage of colorectal carcinoma[J]. Med Arch, 2013, 67(6): 397
- [16] Truta L A, Sales M G. Sol-gel chemistry in biosensing devices of electrical transduction: application to CEA cancer biomarker[J]. Curr Top Med Chem, 2015, 15(3): 256
- [17] Okamura K, Takayama K, Izumi M, et al. Diagnostic value of CEA and CYFRA 21-1 tumor markers in primary lung cancer[J]. Lung Cancer, 2013, 80(1): 45
- [18] Zhu Y B, Ge S H, Zhang L H, et al. Clinical value of serum CEA, CA19-9, CA72-4 and CA242 in the diagnosis and prognosis of gastric cancer[J]. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi, 2012, 15(2): 161

(2015-11-09 修稿)