

文章编号 1006-8147(2020)01-0008-05

论 著

miR-3685 通过靶向 CTTN 抑制宫颈癌细胞的迁移、侵袭及生长

闫晓芳, 谢虹, 汤华

(天津医科大学基础医学院病原生物学系, 天津市生命科学中心实验室, 天津市炎症生物学重点实验室, 天津 300070)

摘要 目的: 微小 RNA (microRNA, miRNA) 通常通过与其靶基因的 3' 非翻译区 (3'UTR) 结合而调控肿瘤细胞的恶性行为, 目前 miR-3685 对肿瘤细胞恶性行为的影响鲜有报道, 本文旨在探讨 miR-3685 对宫颈癌细胞恶性行为及其分子机制的影响。
方法: 生物信息学软件预测 miR-3685 的靶基因, 用 EGFP 报告系统验证。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术检测 miR-3685 和 CTTN (cortactin) 在人类宫颈癌细胞中的表达, 用 transwell 迁移/侵袭实验、Western blot 实验、集落形成实验、细胞周期进程实验分别检测了 miR-3685 和 CTTN 对 HeLa 细胞和 SiHa 细胞的迁移、侵袭能力、EMT 进程、细胞增殖能力及细胞周期进程的影响。
结果: 与对照组相比, 过表达 miR-3685 可抑制宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞的迁移、侵袭及生长, 封闭 miR-3685, 得到相反的结果。过表达 CTTN 可促进宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞的迁移、侵袭及生长, EGFP 报告系统验证 CTTN 是 miR-3685 的直接靶基因 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。
结论: miR-3685 通过抑制 CTTN 的表达而抑制宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞的迁移、侵袭及生长。
关键词 miR-3685; 宫颈癌; CTTN; 上皮间质转化; 细胞周期

中图分类号 R737.33

文献标志码 A

miR-3685 inhibits migration, invasion and growth of cervical cancer cells by targeting CTTN

YAN Xiao-fang, XIE Hong, TANG Hua

(Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin Life Science Research Center, Tianjin Key Laboratory of Inflammation Biology, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: MicroRNAs (miRNAs) usually regulate the malignant behavior of tumor cells by binding to the 3' untranslated region (3'UTR) of their target genes. But the effect of miR-3685 on the malignant behavior of cervical cancer cells has not been reported. This study aims to investigate the effect of miR-3685 on the malignant behavior and molecular mechanism of cervical cancer cells.
Methods: The bioinformatics software was used to predict the target gene of miR-3685 and verified it with the EGFP reporter system. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) technique was used to detect the expression of miR-3685 and CTTN (cortactin) in human cervical cancer cells. Transwell migration/invasion assay, Western blot assay, colony formation assay and flow cytometry assay were used to detect migration, invasion, EMT progression, cell proliferation and cell cycle process of miR-3685 and CTTN in HeLa cells and SiHa cells.
Results: Compared with the control group, overexpression of miR-3685 inhibited migration, invasion and growth of HeLa cells and SiHa cells, while blocking miR-3685 gave the opposite result. Overexpression of CTTN promoted migration and invasion and growth of cervical cancer HeLa and SiHa cells. The EGFP reporter system verified that CTTN is a direct target gene for miR-3685. **Conclusion:** miR-3685 inhibits the migration, invasion and growth of HeLa cells and SiHa cells by inhibiting the expression of CTTN.

Key words miR-3685; cervical cancer; CTTN; EMT; cell cycle

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 在全世界可以导致死亡的癌症中排名第四位^[1]。研究表明, 每年有超过 50 万名女性被诊断患有宫颈癌, 每年因患有宫颈癌而死亡的人数超过 30 万^[2]。所以研究用于宫颈癌早期诊断或预后的新型生物标志物对于女性健康是必须的。miRNA 是短链单链非编码 RNA, 参与各种生理和病理过程^[3]。大量研究表明 miRNA 在包括癌症在内的多种疾病中发挥着不同

的作用^[4-5], 它们可能以一种致癌基因的身份去参与调节细胞的增殖能力、凋亡速率、侵袭性及转移^[6]。例如, miR-148a 作为肿瘤抑制基因通过直接靶定 Wnt1 mRNA 的 3'UTR 抑制肺癌细胞的迁移和侵袭^[7], miR-221-3p 可以通过靶向 THBS2 来治疗癌症^[8], 本实验室报道了一种新的 miRNA (miR-G-1) 通过靶向 TMED5 促进宫颈癌细胞的恶性行为和核自噬^[9]。但是, 目前 miR-3685 对宫颈癌细胞的功能研究知之甚少, 作用机制也尚不清楚。CTTN 基因位于人染色体 11q13, 有研究证明其能够促进食管癌细胞系

基金项目 国家自然科学基金重大研究计划集成项目 (91629302)

作者简介 闫晓芳 (1993-), 女, 硕士在读, 研究方向: 病原生物学; 通信作者: 汤华, E-mail: htang2002@yahoo.com。

的运动、侵袭以及抗失巢凋亡能力^[10]。比起正常组织,在26%的乳腺癌组织中可以观察到CTTN含量增多,并且CTTN的过表达可以促进多种癌细胞的运动性和侵袭性^[11-12],但是CTTN对宫颈癌细胞的功能作用尚不清楚。所以,本文旨在探讨miR-3685和CTTN对宫颈癌细胞恶性行为的影响,从而为宫颈癌提供新的治疗思路。

综上所述,本实验结果首次证明了miR-3685通过抑制宫颈癌细胞迁移、侵袭和生长来抑制其恶性行为,本研究强调了miR-3685-CTTN轴在宫颈癌发病机制中的重要性,该调控轴可以为预防宫颈癌的发生提供潜在的价值和治疗方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料 宫颈癌HeLa和SiHa细胞(美国ATCC公司),RPMI1640液体培养基、DMEM液体培养基(美国GIBCO公司),细胞上皮标志物E-cadherin抗体、细胞间质标志物vimentin抗体、EGFP抗体、偶联HRP的山羊抗兔抗体(天津赛尔生物公司),细胞培养箱(美国Thermo Fisher公司),胎牛血清(FBS;美国Hyclon公司),Lipofectamine™ 2000 reagent(美国Invitrogen公司),Matrigel、流式细胞仪(美国BD Biosciences公司),RNase A(100U;德国Calbiochem公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌细胞系HeLa和SiHa细胞在含有8%或10%胎牛血清、100 μg/mL链霉素和100 IU/mL青霉素的RPMI-1640或DMEM培养基中培养,将细胞孵育在37℃,5%CO₂的培养箱中,2~3 d更换1次新鲜培养液,待细胞汇合度达到80%~90%时进行传代培养。

1.2.2 细胞转染 提前1 d接种指数生长的HeLa细胞和SiHa细胞于24孔细胞培养板,使细胞汇合度在培养14~18 h时达到70%~80%。配制A转染液:在100 μL液体培养基(Opti-MEMα)中加入1 μg实验组质粒或者对照组质粒,吹吸混匀。配制B转染液:把1 μL Lipofectamine 2000 Reagent脂质体加在100 μL液体Opti-MEMα中混匀,5 min后,将A、B液混合,20 min后,将混合液加入到24孔细胞培养板,4~6 h弃掉培养板中的液体,每孔加入1 mL含血清的液体培养基,在培养箱中继续孵育。

1.2.3 实时荧光定量PCR(RT-qPCR) 使用SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa,大连,中国)进行RT-qPCR以检测miRNA和mRNA的表达水平。小RNA特异性茎环逆转录引物用于进行miRNA的逆转录。U6 snRNA和β-肌动蛋白分别用作miRNA和mRNA

的内源对照。

1.2.4 迁移/侵袭实验 根据制造商的说明书,使用不含或含Matrigel的transwell小室进行迁移/侵袭测定。转染后24 h,用1×PBS洗涤细胞,重悬于无血清培养基中并接种到上室(6×10⁴细胞用于迁移,8×10⁴细胞用于侵袭)。下室加入600 μL含有20%FBS的HeLa细胞或SiHa细胞的培养基。温育48或72 h,将迁移/侵袭的细胞用75%甲醇-25%冰醋酸固定并用结晶紫染色。在显微镜下放大100倍对5个随机选择的视野进行成像,并在Nikon TE2000显微镜下对迁移/侵袭的细胞计数。

1.2.5 集落形成实验 在转染后24 h,将HeLa和SiHa细胞以500个cell/孔的密度接种到12孔板中。每3 d更换1次新鲜培养基,持续两周。用结晶紫染色,然后计算菌落形成率。

1.2.6 细胞周期实验 转染后24 h,用PBS洗涤细胞3次并用胰蛋白酶消化,然后用95%的乙醇固定过夜。PBS洗涤细胞,并在PBS/0.05%Triton X-100混合液中重悬,将细胞与不含DNA酶的RNase A在室温下共温育30 min,并用25 mg/mL的碘化丙啶染色。室温、黑暗中静置30 min,然后用流式细胞仪检测细胞周期变化。

1.2.7 Western blot 通过蛋白质印迹实验检测蛋白质的表达水平。转染48 h后,收集细胞,用RIPA裂解液在4℃条件下裂解30 min。在10%SDS-PAGE凝胶中分离等量的细胞裂解物,并转移到聚偏二氟乙烯膜上,用5%脱脂乳(TBST稀释)在室温下封闭2 h,加入一抗4℃孵育过夜,随后,将膜与辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗在室温下孵育2 h。通过增强的化学发光液检测蛋白质表达,通过Image J量化条带强度。

1.3 统计学处理 所有统计分析均由Graphpad Prism 7.0进行。使用配对Student's *t*检验评估对照组和实验组之间的显著性差异。*P*<0.05被认为具有统计学意义。数据显示为来自至少3次独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 。

2 结果

2.1 miR-3685抑制宫颈癌细胞的迁移/侵袭及生长 构建miR-3685过表达质粒(pcDNA3/miR-3685)并商业合成其封闭剂(ASO-miR-3685),用RT-qPCR实验检测其有效性,结果表明质粒均有效(图1A)。Transwell迁移/侵袭实验结果表明:过表达miR-3685可显著抑制HeLa和SiHa细胞的迁移/侵袭能力,而封闭miR-3685可促进HeLa和SiHa细胞的迁移/侵袭能力(迁移:图1B,侵袭:图1C)。Western blot实验

(图 1D)、克隆形成实验(图 1E)及细胞周期实验(HeLa:图 1F, SiHa:图 1G)结果表明:过表达 miR-3685 能抑制 HeLa 和 SiHa 细胞的 EMT 进程、集落形成能力及细胞周期进程,而封闭 miR-3685 却得到相反的结果。

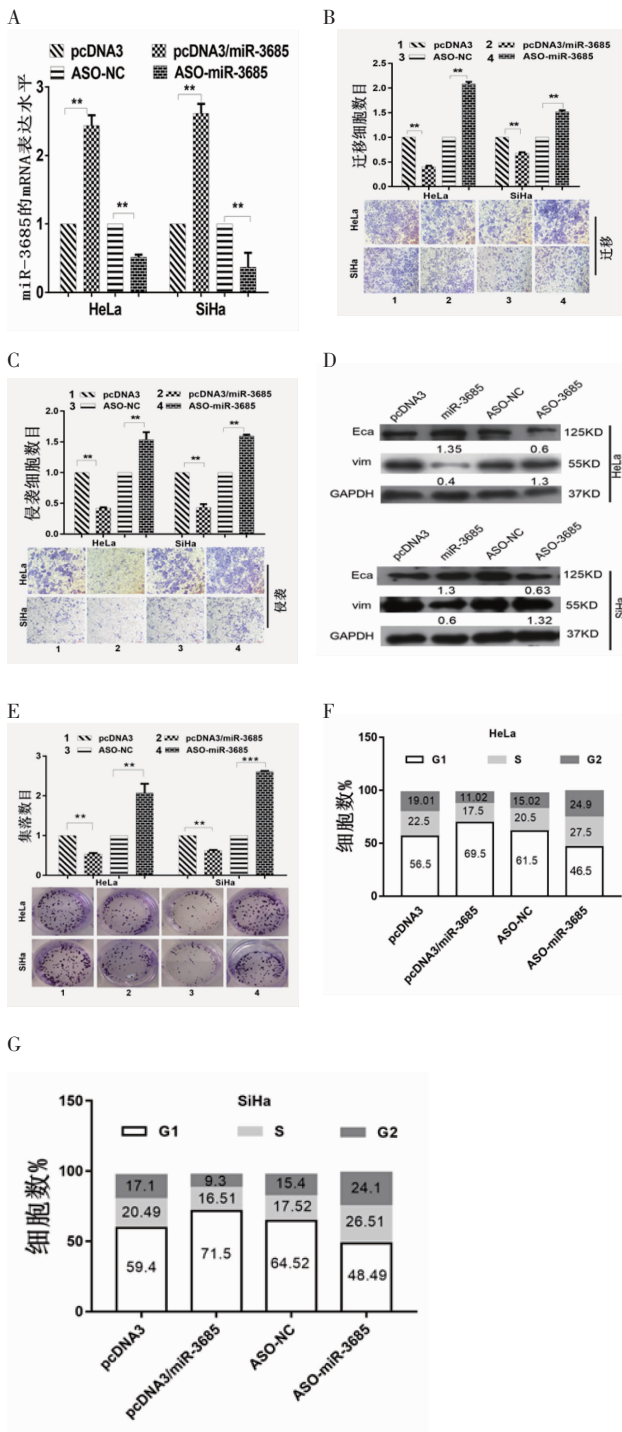


图 1 miR-3685 对 HeLa 和 SiHa 细胞的迁移/侵袭能力、EMT 进程、集落形成能力及细胞周期进程的影响

Fig 1 Effect of miR-3685 on migration/invasiveness, EMT progression, colony forming ability and cell cycle progression of HeLa and SiHa cells

RT-qPCR 实验检测 miR-3685 的过表达质粒及其封闭剂 ASO-miR-3685 在 HeLa 和 SiHa 细胞中是否有效 (A); Transwell 实验检测过表达或封闭 miR-3685 对宫颈癌细胞迁移 (B)/侵袭 (C) 能力的影响; Western blot 实验验证过表达或封闭 miR-3685 对宫颈癌细胞 EMT 进程的影响 (D); 克隆形成实验检测 miR-3685 对宫颈癌细胞集落形成能力的影响 (E); 流式细胞术检测 miR-3685 对 HeLa (F) 和 SiHa (G) 细胞的细胞周期进程的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

2.2 CTTN 是 miR-3685 的直接作用靶基因 为了进一步研究 miR-3685 的潜在机制, 使用 miRBase 2.1 和 TargetScan7.1 预测 miR-3685 的潜在靶点, 根据预测得分情况挑选了以下 4 种候选靶基因, 即 CTTN, PRKAR2B, ULK2, RERE。在 HeLa 细胞中将 miR-3685 结合 CTTN, PRKAR2B, ULK2, RERE 的 3' UTR (WT) 序列分别克隆到 pcDNA3-EGFP 报告系统中, 并在 HeLa 细胞中与 pcDNA3/miR-3685 共转染, 用 Western blot 实验评估这 4 种候选靶基因的 EGFP 蛋白表达水平。结果发现, 相比其他 3 种候选靶基因, 用 pcDNA3-EGFP-CTTN-3' UTR 与 pcDNA3/miR-3685 共转时, EGFP 的蛋白表达水平降低的最明显 (图 2A), 于是笔者初步选择 CTTN 作为 miR-3685 的靶基因进行后续的验证实验。在 HeLa 细胞中将 miR-3685 结合 CTTN 的 3' UTR (WT) 或 (mut) 序列克隆到 pcDNA3-EGFP 报告系统中, 并在 HeLa 细胞中与 pcDNA3/miR-3685 或 ASO-miR-3685 分别共转染。进行 Western blot 分析以评估 CTTN 的 EGFP 蛋白表达水平。miR-3685 与 CTTN 野生型及其突变型之间的结合位点如图 2B 所示。用 pcDNA3-EGFP-CTTN-3' UTR 与 pcDNA3/miR-3685 共转时, Western blot 实验显示 EGFP 蛋白水平明显降低, 用 pcDNA3-EGFP-CTTN-3' UTR 与 ASO-miR-3685 共转时, Western blot 实验显示 EGFP 蛋白水平有所升高 (图 2C), 用 pcDNA3-EGFP-CTTN-3' UTR-mut 与 pcDNA3/miR-3685 或 ASO-miR-3685 共转时, Western blot 实验显示 EGFP 蛋白水平没有明显变化 (图 2D)。笔者进一步测量了 CTTN 的 mRNA 表达水平和内源性蛋白表达水平, 结果发现, 过表达 miR-3685 后, CTTN 的 mRNA 表达水平和内源性蛋白表达水平明显降低, 而过表达 ASO-miR-3685 后, CTTN 的 mRNA 表达水平和内源性蛋白表达水平明显升高 (图 2E, F)。这些数据证明 CTTN 是 miR-3685 的直接靶标, 并且它的表达受 miR-3685 的负调节。

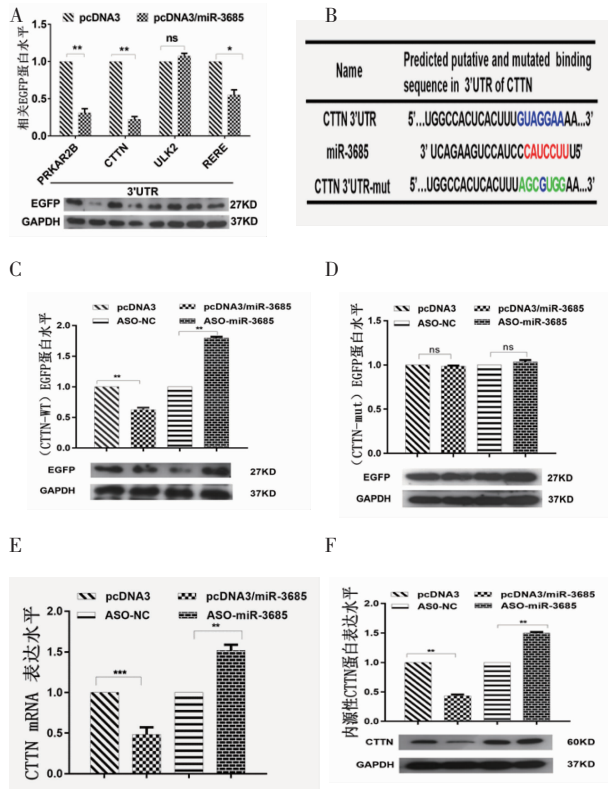


图 2 在 HeLa 细胞中验证 CTTN 是 miR-3685 的直接靶标

Fig 2 Verify that CTTN is a direct target of miR-3685 in HeLa cells

用 Western blot 实验验证 4 种候选靶基因 (CTTN, PRKAR2B, ULK2, RERE) 的 EGFP 蛋白表达水平的变化 (A); miR-3685 与 CTTN 野生型及突变型之间的结合位点 (B); pcDNA3-EGFP-CTTN-3' UTR 与 pcDNA3/miR-3685 或 ASO-miR-3685 共转, 用 Western blot 实验验证 EGFP 蛋白水平的变化 (C); pcDNA3-EGFP-CTTN-3' UTR-mut 与 pcDNA3/miR-3685 或 ASO-miR-3685 共转, 用 Western blot 实验验证 EGFP 蛋白水平的变化 (D); 在 HeLa 细胞中转染 pcDNA3/miR-3685 或 ASO-miR-3685 质粒, 用 RT-qPCR 和 Western blot 实验检测 CTTN 的 mRNA (E) 和内源性蛋白表达水平 (F) 变化 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: 无显著性差异)。

2.3 CTTN 对宫颈癌细胞迁移/侵袭、EMT 进程、集落形成能力及细胞周期进程的影响 CTTN 的过表达和敲降质粒用于研究它们在宫颈癌细胞中的作用。通过 RT-qPCR (图 3A) 和 Western blot (图 3B) 实验检测其是否有效, 结果表明质粒均有效。Transwell 迁移/侵袭实验结果表明: 过表达 CTTN 促进了 HeLa 和 SiHa 细胞的迁移/侵袭能力, 而敲降 CTTN 抑制了 HeLa 和 SiHa 细胞的迁移/侵袭能力 (迁移: 图 3C, 侵袭: 图 3D)。Western blot 实验 (图 3E)、克隆形成实验 (图 3F) 及细胞周期实验 (HeLa: 图

3G, SiHa: 图 3H) 结果表明: 过表达 CTTN 可促进 HeLa 和 SiHa 细胞的 EMT 进程、集落形成能力及细胞周期进程, 敲降 CTTN, 得到相反的结果。

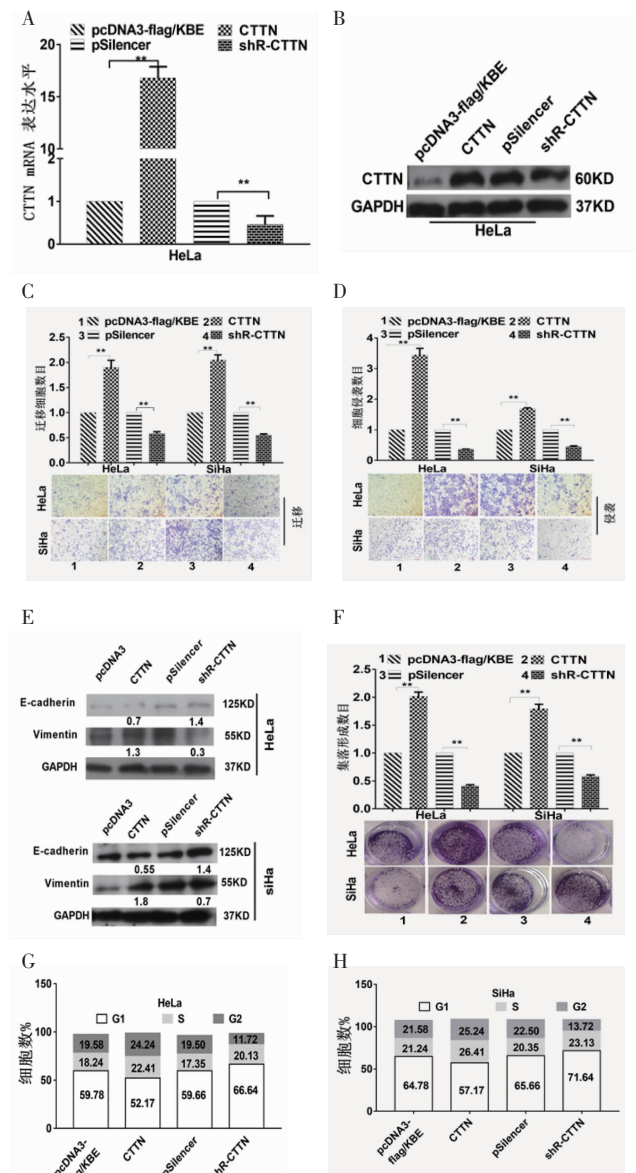


图 3 CTTN 对宫颈癌细胞迁移/侵袭、EMT 进程、集落形成能力及细胞周期进程的影响

Fig 3 Effects of CTTN on migration/invasion, EMT progression, colony forming ability and cell cycle progression of cervical cancer cells

RT-qPCR 实验 (A) 和 Western blot 实验 (B) 检测 CTTN 的过表达质粒及其敲降质粒在 HeLa 细胞中是否有效; 过表达或敲降 CTTN 对宫颈癌细胞迁移 (C)/侵袭 (D) 能力的影响; Western blot 实验验证过表达或敲降 CTTN 对宫颈癌细胞 EMT 进程的影响 (E); 克隆形成实验检测 CTTN 对宫颈癌细胞集落形成能力的影响 (F); 流式细胞术检测 CTTN 对 HeLa (G) 和 SiHa (H) 细胞的周期进程的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

3 讨论

miRNA 在组织和细胞中通常都是异常表达的, 这表明它们在临床应用中可作为诊断、治疗或预后的生物标志物^[13]。比如, 在肝癌中低表达的 miR-193a-5p 与其患者的生存期缩短有关^[14], 在结直肠癌细胞中, miR-25-3p 可促进结直肠细胞的血管通透性和血管生成, 表明其具有潜在的癌症进展价值^[15]。miR-21siRNA 干扰载体可以抑制宫颈癌 Hela 细胞中 miR-21 基因的表达, 促进细胞凋亡, 延缓细胞周期进程^[16]。本研究内容揭示了 miR-3685 可以抑制宫颈癌细胞的迁移、侵袭、EMT 进程、细胞增殖以及细胞周期进程。这些结果为 miR-3685 的功能作用提供了新的见解。

最近, 有研究报道称, 在结肠癌细胞中, CTTN 可以通过 invadopodia 形成而募集 FMNL2 来加速肌动蛋白聚合和内体运动^[17], 还有报道表明在结直肠癌中 CTTN 可以通过激活 EGFR-MAPK 途径来促进细胞的增殖^[18]。同时, 一些特异性 miRNA 也可以调节 CTTN 的表达, 例如, miR-182 可以通过调节 CTTN 的表达从而抑制肺癌的转移、侵袭和增殖能力^[19], miR-542-3p 通过抑制 cortactin 的表达抑制结直肠癌细胞的生长和侵袭^[20]。在本研究内容中, 揭示了 CTTN 可以促进宫颈癌细胞的迁移、侵袭能力及生长。还揭示了 miR-3685 对 CTTN 的负性调控作用。

总之, 本实验结果首次证明了在宫颈癌中 miR-3685 可以通过抑制 CTTN 的表达而发挥抑癌作用。本研究强调了 miR-3685-CTTN 轴在宫颈癌发病机制中的重要性。miR-3685 负调控 CTTN 的表达可以为宫颈癌的治疗及预防提供新的参考方向。

参考文献:

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87
- [2] Cohen P A, Jhingran A, Oaknin A, et al. Cervical cancer[J]. Lancet, 2019, 393(10167):169
- [3] Carrington J C, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development[J]. Science, 2003, 301(5631):336
- [4] Lujambio A, Lowe S W. The microcosmos of cancer[J]. Nature, 2012, 482(7385):347
- [5] He L, Thomson J M, Hemann M T, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene[J]. Nature, 2005, 435(7043):828
- [6] Pichler M, Calin G A. MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to their clinical application in patients[J]. Br J Cancer, 2015, 113(4):569
- [7] Chen Y, Min L F, Ren C L, et al. miRNA-148a serves as a prognostic factor and suppresses migration and invasion through Wnt1 in non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2017, 12(2):e0171751
- [8] Wei W F, Zhou C F, Wu X G, et al. MicroRNA-221-3p, a TWIST2 target, promotes cervical cancer metastasis by directly targeting THBS2[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(12):3220
- [9] Yang Z, Sun Q, Guo J, et al. GRSF1-mediated MIR-G-1 promotes malignant behavior and nuclear autophagy by directly upregulating TMED5 and LMNB1 in cervical cancer cells[J]. Autophagy, 2019, 15(4):668
- [10] 杨海. CTTN 促进食管癌侵袭转移的分子机制研究[D]. 北京协和医学院: 中国医学科学院北京协和医学院中国医学科学院清华大学医学部, 2010
- [11] Callagy G, Pharoah P, Chin S F, et al. Identification and validation of prognostic markers in breast cancer with the complementary use of array-CGH and tissue microarrays[J]. J Pathol, 2005, 205(3):388
- [12] Chuma M, Sakamoto M, Yasuda J, et al. Overexpression of cortactin is involved in motility and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2004, 41(4):629
- [13] Ahmad N, Haider S, Jagannathan S, et al. MicroRNA theragnostics for the clinical management of multiple myeloma[J]. Leukemia, 2013, 28: 732
- [14] Roy S, Hooiveld G J, Seehawer M, et al. microRNA 193a-5p regulates levels of nucleolar and Spindle-Associated protein 1 to suppress hepatocarcinogenesis[J]. Gastroenterology, 2018, 155(6):1951
- [15] Zeng Z C, Li Y L, Pan Y J, et al. Cancer-derived exosomal miR-25-3p promotes pre-metastatic niche formation by inducing vascular permeability and angiogenesis[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):5395
- [16] 徐文莉, 廖长征, 罗艺, 等. miRNA-21siRNA 对宫颈癌 Hela 细胞周期及细胞凋亡的影响[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(10): 1355
- [17] Ren X L, Qiao Y D, Li J Y, et al. Cortactin recruits FMNL2 to promote actin polymerization and endosome motility in invadopodia formation[J]. Cancer Lett, 2018, 419:245
- [18] Zhang X J, Liu K, Zhang T, et al. Cortactin promotes colorectal cancer cell proliferation by activating the EGFR-MAPK pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(1):1541
- [19] Li Y W, Zhang H B, Gong H, et al. miR-182 suppresses invadopodia formation and metastasis in non-small cell lung cancer by targeting cortactin gene[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1):141
- [20] Long H C, Gao X, Lei C J, et al. miR-542-3p inhibits the growth and invasion of colorectal cancer cells through targeted regulation of cortactin[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(4):1112

(2019-06-15 收稿)