

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.02.007

· 基础研究 ·

## LncRNA MALAT1 通过调控 miR-124-3p/IGF2BP1 分子轴促进宫颈癌细胞增殖和转移

周莉, 秦娟, 陆安伟(贵阳市妇幼保健院 妇产科, 贵州 贵阳 550003)

**[摘要]** **目的:** 探讨 lncRNA MALAT1 通过调控 miR-124-3p/IGF2BP1 分子轴介导宫颈癌细胞增殖和转移的影响。**方法:** 选取 2014 年 4 月至 2017 年 12 月在贵阳市妇幼保健院妇产科收治的、经手术切除的 45 例宫颈癌患者癌组织及相应癌旁组织标本, 以及宫颈癌细胞系 SiHa、Caski、HeLa 和 C33a, 采用 qPCR 法检测癌组织和癌细胞系中 MALAT1 的表达水平。构建 MALAT1 敲降载体、miR-124-3p inhibitor 及 IGF2BP1 过表达载体转染宫颈癌细胞, 采用 CCK-8、Transwell、Wb 及免疫荧光实验探讨 MALAT1 或其敲降后通过 miR-124-3p/IGF2BP1 分子轴对宫颈癌细胞增殖、侵袭和上皮间质转化的影响。采用双荧光素酶报告基因检测 lncRNA MALAT1、miR-124-3p 及 IGF2BP1 的靶向调控关系。**结果:** MALAT1 在宫颈癌组织和细胞系中高表达 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。同时, 敲降 MALAT1 显著抑制宫颈癌细胞增殖、侵袭和上皮间质转化 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。双荧光素酶报告基因证实 MALAT1 靶向作用 miR-124-3p 并下调其表达水平, miR-124-3p 可负调控 IGF2BP1 的表达。实验进一步证实敲降 MALAT1 通过靶向上调 miR-124-3p 对 IGF2BP1 的抑制作用, 进而抑制宫颈癌细胞增殖、侵袭和上皮间质转化 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论:** lncRNA MALAT1 通过下调 miR-124-3p/IGF2BP1 分子轴促进宫颈癌细胞增殖、侵袭和上皮间质转化, 为临床宫颈癌早期诊断/治疗提供了潜在的分子靶点。

**[关键词]** 宫颈癌; 增殖; 上皮间质转化; lncRNA MALAT1; miR-124-3p; IGF2BP1

**[中图分类号]** R730.5; R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)02-0182-08

## LncRNA MALAT1 promotes proliferation and metastasis of cervical cancer cell via regulating miR-124-3p/IGF2BP1 axis

ZHOU Li, QIN Juan, LU Anwei (Department of Obstetrics and Gynecology, Maternal and Child Health Hospital of Guiyang City, Guiyang 550000, Guizhou)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mechanism of lncRNA MALAT1 modulating proliferation and metastasis of cervical cancer cells via regulating miR-124-3p/IGF2BP1 axis. **Methods:** A total of 45 cases of cervical cancer tissues and corresponding paracancerous tissues resected from patients, who were admitted to the Department of Obstetrics and Gynecology of Guiyang Maternal and Child Health Hospital during April 2014 and December 2017, were included in this study; in addition, cervical cancer cell lines SiHa, Caski, HeLa and C33a were also collected for this study. qPCR was applied to detect the expression of MALAT1 in cervical cancer tissues and cell lines. MALAT1-knockdown vectors, miR-124-3p inhibitors and IGF2BP1-overexpression vectors were constructed and used to transfect cervical cancer cells, respectively; the influence of MALAT1 or MALAT1 knockdown on cell proliferation, invasion and epithelial mesenchymal transition (EMT) via miR-124-3p/IGF2BP1 axis were determined by CCK-8 assay, Transwell assay, Wb and immunofluorescence, respectively. The interaction between MALAT1, miR-124-3p, and IGF2BP1 were verified by dual luciferase reporter gene assay. **Results:** MALAT1 was up-regulated in cervical cancer tissues and cell lines ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Meanwhile, MALAT1 knockdown remarkably inhibited proliferation, invasion and EMT of cervical cancer cells ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Moreover, dual-luciferase reporter gene assay showed that MALAT1 directly interacted with miR-124-3p and down-regulated its expression, while miR-124-3p negatively regulated IGF2BP1 expression. Our experiment further validated that MALAT1 knockdown suppressed proliferative, invasion and EMT of cervical cancer cells via inducing the inhibitory effect of miR-124-3p on IGF2BP1 ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** MALAT1 promotes the proliferation, invasion and EMT of cervical cancer cells by down-regulating miR-124-3p/IGF2BP1 axis, which provides potential molecular targets for early diagnosis or treatment of cervical cancer.

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No.81560287)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No.81560287)

**[作者简介]** 周莉(1975-),女,硕士,副主任医师,主要从事妇科肿瘤的临床与基础研究,E-mail: 2410415807@qq.com

**[通信作者]** 陆安伟(LU Anwei, corresponding author),主任医师,硕士生导师,主要从事妇科肿瘤研究,E-mail: luanwei1115@sina.com

[Key words] cervical cancer; proliferation; epithelial mesenchymal transition; lncRNAMALAT1; miR-124-3p; IGF2BP1

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(2): 182-189. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.02.007]

宫颈癌是女性常见恶性肿瘤之一,发病原因目前尚不清楚,早婚、早育、多产及性生活紊乱的妇女有较高的患病率。宫颈癌早期治疗效果较好,中晚期患者预后较差,因此早发现、早治疗是提高宫颈癌患者生存率的关键<sup>[1]</sup>。为此,寻找可用于宫颈癌早期诊断、术后监测及预后判断的生物标志物具有重要的临床意义。近年来,长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 已被证实在多种肿瘤的增殖和转移过程中发挥重要的调节作用<sup>[2-3]</sup>。例如, lncRNA MALAT1 作为肿瘤的促癌基因参与调控宫颈癌<sup>[4]</sup>、乳腺癌<sup>[5]</sup>、肺癌<sup>[6]</sup>、结直肠癌<sup>[7]</sup>和胃癌等<sup>[8]</sup>多种瘤细胞的增殖和转移。同时,有研究<sup>[9]</sup>证实, lncRNA 与 miRNA 的相互作用在癌症发生过程中扮演重要角色,而 miRNA 能够通过调控其下游蛋白介导肿瘤发展进程,说明 lncRNA-miRNA-mRNA 调控网络有望成为宫颈癌诊断/治疗的分子标志物。本课题首先通过检测 lncRNA MALAT1 在宫颈癌患者组织标本及细胞系的表达水平,然后探讨 lncRNA MALAT1 通过调控 miR-124-3p 和 IGF2BP1 对宫颈癌细胞增殖、转移和上皮间质转化的影响,为探寻诊治宫颈癌的标志物提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

收集贵阳市妇幼保健院妇产科 2014 年 4 月至 2017 年 12 月进行手术切除且有资料完整的 45 例宫颈癌组织及其相应的癌旁组织,迅速保存于液氮中。病例纳入标准:(1)经宫颈和宫颈管活检组织病理、宫颈刮片细胞学、宫颈碘实验、阴道镜检和宫颈锥切术检查结果确认为宫颈癌;(2)手术前 2 周没有经放化疗等治疗。病例排除标准:(1)之前进行任何放疗或化疗的患者;(2)患者不同意样本的采集;(3)合并有免疫系统疾病的患者。所有研究对象对本研究均签署知情同意书,本研究经贵阳市妇幼保健院伦理委员会批准。

### 1.2 细胞株、主要试剂及仪器

人宫颈癌细胞株 (SiHa、Caski、HeLa 和 C33a) 和人正常宫颈上皮细胞系 (End1/E6E7) 均购自中科院上海细胞研究所。lncRNA MALAT1、miR-124-3p 和 IGF2BP1 的敲降/过表达载体购自上海吉玛制药技术有限公司,DMEM 和胎牛血清购自美国 Biological Industries 公司;Annexin-V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 eBioscience 公司,CCK-8 试剂盒购自武汉华

美生物工程有限公司,Transwell 小室购自美国康宁公司,DNA 酶和 Lipofectamine™ 2000 和逆转录试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司,高纯总 RNA 快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,蛋白提取试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒均购自美国 Bio-Rad 公司;免疫印迹一抗 (antibody-IGF2BP1 (1:1 000)、antibody-E-cadherin (1:1 000)、antibody-N-cadherin (1:1000) 和 antibody-Vimentin (1:1000)) 和二抗 (山羊抗兔 IgG(H+L) (1:500)) 均购于购自美国 CST 公司,双荧光素酶报告基因试剂盒和报告基因载体均购自 Promega 公司;酶标仪、荧光定量 PCR 仪、电泳仪和凝胶成像系统,均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 细胞培养和转染

人宫颈癌细胞株 (SiHa、Caski、HeLa 和 C33a) 和人宫颈上皮细胞 (End1/E6E7) 置于含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 μg/ml 的 DMEM 培养液中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养。

选取对数生长期的宫颈癌 (Caski 和 HeLa) 细胞,采用胰酶消化后,将 2 ml 细胞悬液接种到 6 孔板 (细胞密度为 1×10<sup>5</sup> 个/ml),并于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h,随后按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书方法进行 lncRNA MALAT1 shRNA、miR-124-3p mimics/inhibitor 和 pcDNA-IGF2BP1 转染,转染 48 h 后置于荧光显微镜下观察细胞的转染效果。

### 1.4 qPCR 法检测 MALAT1、miR-124-3p 和 IGF2BP1 的表达

收集宫颈癌组织及转染后 48 h 的宫颈癌细胞,采用 TRIzol 一步法分别提取宫颈癌组织和细胞总 RNA;随后,NanoDrop 检测 RNA 的浓度及纯度,逆转录制备 cDNA。取 2 μl 逆转录产物进行 PCR 检测,以 U6 和 GAPDH 作为内参,引物序列:U6 F 为 5'-GC-CAGCACCATGCTCTTCTA-3',R 为 5'-GGTTCCA-CAGATGCTCAGGTC-3';GAPDH F 为 5'-ACAACCTTTGGTATCGTGAAGG-3',R 为 5'-GC-CATCACGCCACAGTTTC-3';MALAT1 F 为 5'-TGAGGACAACAGGTGAACGA-3',R 为 5'-CCCAAGGCCAACATTACATC-3';miR-124-3p F 为 5'-CGGGTAGCAGGCTTCTGAGT-3',R 为 5'-AAACCCCTCTCTGTCGGTAGCT-3';IGF2BP1 F 为 5'-CAAAGGAGCCGAAAATTCAAAT-3',R 为 5'-CGTCTCACTCTCGGTGTTCA-3'。按试剂盒说明建立终体积为 20 μl 的 PCR 反应体系 (2 μl 逆转录产

物、10  $\mu\text{l}$  SYBR Green Mix、上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各0.5  $\mu\text{l}$ )。PCR热循环参数:95  $^{\circ}\text{C}$  5 min,然后3步反应:94  $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,60  $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,进行45个循环。检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行计算。

### 1.5 Wb检测宫颈癌细胞中IGF2BP1和上皮间质转化相关蛋白的表达

提取细胞中蛋白后,依据二喹啉甲酸试剂盒的指导要求检测蛋白浓度。上样缓冲液加入萃取的蛋白后,加热至95  $^{\circ}\text{C}$ ,维持10 min。每孔样品的载药量是30  $\mu\text{g}$ ,添加10%的聚丙烯酰胺凝胶以分离蛋白。凝胶电泳的电压控制在80~120 V,湿式转运和转膜的压力控制在100 mV,持续45~70 min。在聚偏二氟乙烯转膜后,蛋白密封于5%的牛血清蛋白中维持1 h,再向其中加入一抗,4  $^{\circ}\text{C}$ 下过夜培养。洗膜缓冲液冲洗蛋白3次,每次5 min,随后加入山羊抗兔二抗(1:500),温室中培养1 h。再一次洗膜3次后,加入化学发光试剂显影蛋白。以GAPDH为内参,Bio-rad Gel DolEZ成像器用来成像蛋白,采用Image J软件分析靶带的灰度水平。

### 1.6 CCK-8法检测宫颈癌细胞的增殖活力

将处于对数生长期的宫颈癌Caski和HeLa细胞接种于96孔板(细胞密度为 $1 \times 10^4$ 个/孔),每孔含培养基100  $\mu\text{l}$ ,并设计3个复孔。在Caski和HeLa细胞中分别转染MALAT1 sh1、pcDNA-IGF2BP1和miR-124-3p inhibitor。于待检测前1 h,向每孔加入10  $\mu\text{l}$  CCK-8溶液,将培养板在培养箱内孵育4 h,用酶标仪测定在450 nm处的光密度(D)值。

### 1.7 Transwell实验检测宫颈癌细胞的侵袭能力

选择转染细胞为实验组,未转染为对照组。分别将各组细胞用胰酶消化处理后,接种于Transwell小室24孔板内,上室加100  $\mu\text{l}$ (细胞密度为 $2 \times 10^5$ 个/ml)细胞悬液,下室加250  $\mu\text{l}$ 含10%胎牛血清的培养基,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养48 h后,取出小室,棉签擦去微孔膜上室的细胞,PBS小心冲洗小室上下面2遍,4%的多聚甲醛固定侵袭并黏附到小室微孔膜下面的细胞15 min,结晶紫染色15 min,PBS冲洗小室,干燥后置于100倍的倒置显微镜观察。

### 1.8 Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术检测宫颈癌细胞的凋亡

选取转染组和未转染组Caski和HeLa细胞并培养至对数生长期,PBS清洗2次。均匀地混合细胞与500  $\mu\text{l}$ 预冷的1 $\times$ 结合缓冲液,5  $\mu\text{l}$  Annexin-V-FITC,室温避光孵育15 min,然后在上机前5 min再加入2.5  $\mu\text{l}$  PI染色,均匀混合后上流式细胞仪检测细胞的凋亡率。

### 1.9 双荧光素酶报告基因验证MALAT1、miR-124-

### 3p和IGF2BP1的靶向作用关系

首先将lncRNA MALAT1的候选靶基因miR-124-3p 3'UTR靶序列或miR-124-3p的候选靶基因IGF2BP1 3'UTR靶序列插入到萤火虫荧光素酶基因下游。将表达载体pcDNA-EGFP-pre-lncRNA MALAT1与其靶基因miR-124-3p验证载体pmir-GLO-lncRNA MALAT1-miR-124-3p 3'UTR;将表达载体pcDNA-EGFP-pre-miR-124-3p与其靶基因IGF2BP1验证载体pmirGLO-miR-124-3p-IGF2BP1 3'UTR分别共转染到293T细胞,并设置空质粒载体与lncRNA MALAT1或miR-124-3p表达载体共转染对照。具体方法:在24孔板中,每孔细胞中转染pmir-GLO-miR-基因3'UTR 200 ng、pcDNA-EGFP-pre-miRNA 600 ng及阴性对照30 pmol/L。50  $\mu\text{l}$  Opti-MEM I培养基稀释2  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000试剂后室温孵育5 min;混合需转染的DNA和稀释的Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000,室温孵育20 min后将复合物加到含0.4 ml Opti-MEM I培养基的细胞中,轻轻摇动培养板混匀;在37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱培养8 h后换0.5 ml含10%胎牛血清,不含抗生素的正常DMEM培养基,在37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养48 h,收集细胞。荧光素酶检测按照双荧光素酶报告基因试剂盒说明书,采用酶标仪检测萤火虫和海肾荧光值,并以海肾荧光值作为内参。

### 1.10 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行统计分析,应用Graph-Pad Prism 7软件对实验数据进行相关图片绘制。所有实验均重复3次。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MALAT1在宫颈癌组织及细胞系中高表达

qPCR检测结果(图1A)显示,MALAT1在宫颈癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织( $4.80 \pm 0.91$  vs  $1.77 \pm 0.87$ ,  $t = -15.72$ ,  $P < 0.01$ )。采用Kaplan-Meier生存曲线分析(图1B)发现,MALAT1高表达宫颈癌患者(28例)的生存率显著低于低表达的患者(17例)[ $(2.76 \pm 0.54)$  vs  $(5.60 \pm 0.41)$ ,  $P < 0.01$ ]。此外,MALAT1在宫颈癌细胞系(SiHa、C33a、Caski和HeLa)中的表达水平显著高于人正常宫颈上皮细胞(End1/E6E7)( $t = -5.29$ 、 $-4.87$ 、 $-13.28$ 、 $-10.39$ ,  $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ,图1C),且Caski和HeLa细胞中MALAT1的表达水平明显高于SiHa和C33a(图1C),故选择Caski和HeLa细胞进行后续实验。以上结果表明,MALAT1的异常表达可能与宫颈癌发生发展相关。



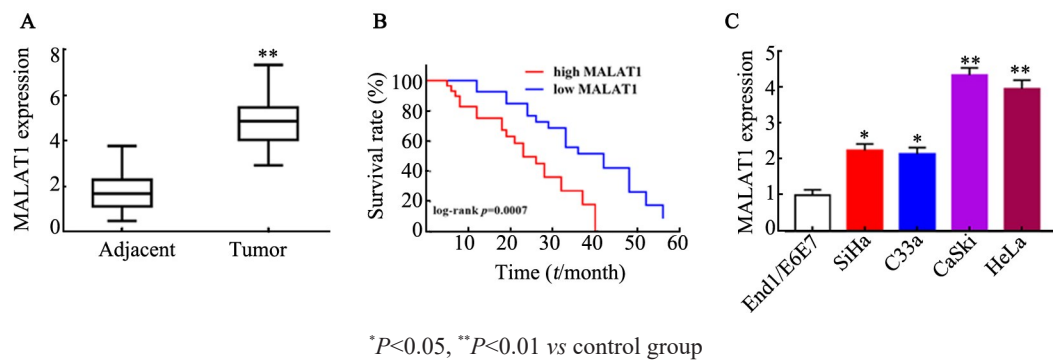


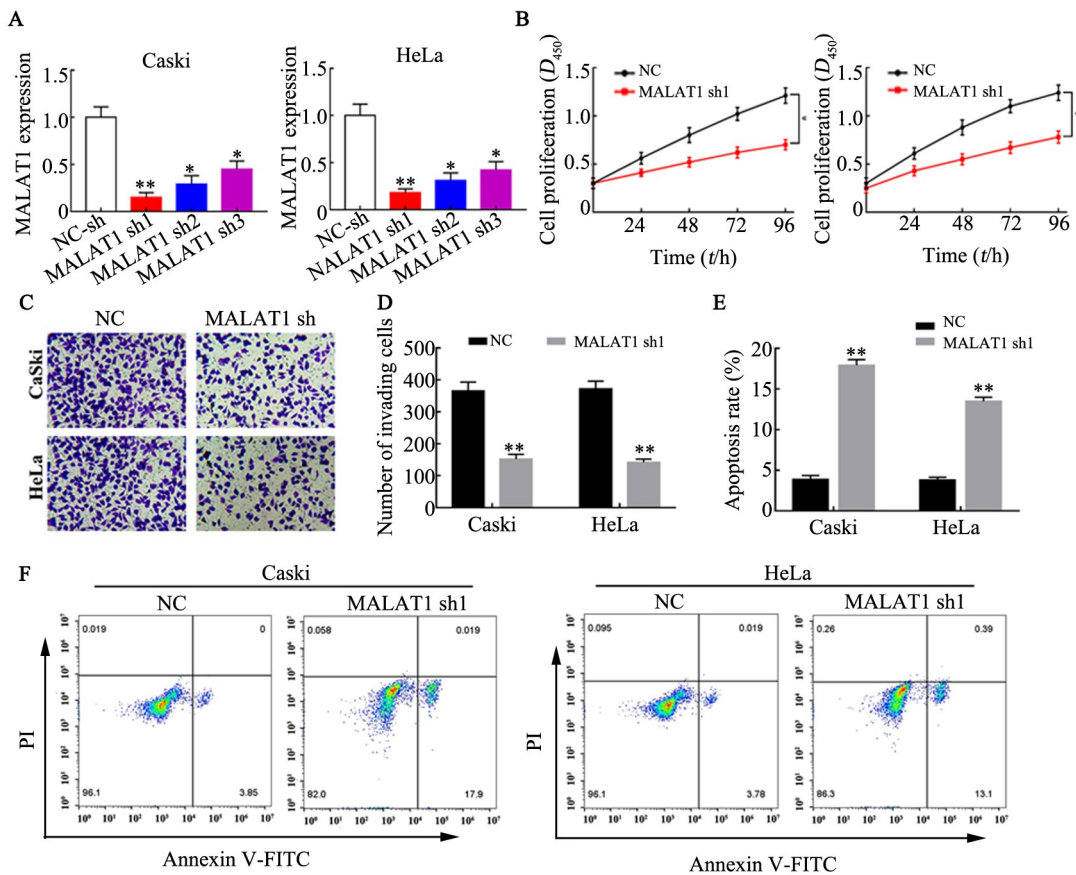
图1 MALAT1在宫颈癌组织和细胞系中的表达水平及其与患者预后的关系

Fig. 1 Expression of MALAT1 in cervical cancer tissues and cell lines and its relationship with patients' prognosis

2.2 敲降MALAT1显著抑制宫颈癌细胞的增殖和侵袭并促进其凋亡

qPCR法检测结果(图2A)显示,相比于对照组,转染MALAT1 siRNA可明显下调MALAT1在宫颈癌细胞系Caski和HeLa中的表达水平( $t_{\text{Caski}}=7.03$ 、 $3.92$ ,  $t_{\text{HeLa}}=6.48$ 、 $4.78$ 、 $3.87$ ,  $P<0.01$ 或 $P<0.05$ ),且转染MALAT1 sh1的效果优于MALAT1 sh2和MALAT1 sh3。CCK-8检测结果(图2B)显示,敲降MALAT1可显著抑制Caski和HeLa细胞的增殖活力( $t_{\text{Caski}}=2.18$ ,

$t_{\text{HeLa}}=2.23$ ,  $P<0.01$ )。Transwell小室法检测结果(图2C、D)显示,敲降MALAT1可显著抑制Caski和HeLa细胞的侵袭能力( $t_{\text{Caski}}=6.71$ ,  $t_{\text{HeLa}}=8.85$ ,  $P<0.01$ )。此外,流式细胞术检测结果(图2E、F)显示,敲降MALAT1可显著促进Caski和HeLa细胞凋亡( $t_{\text{Caski}}=16.20$ ,  $t_{\text{HeLa}}=15.88$ ,  $P<0.01$ )。以上实验结果表明,敲降MALAT1可显著抑制宫颈癌Caski和HeLa细胞的增殖和侵袭能力并促进其凋亡。



\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs NC group

A: qPCR was used to detect the expression of MALAT1 in Caski and HeLa cells; B: CCK-8 was applied to evaluate the cell viability; C, D: Transwell was used to detect the invasion of Caski and HeLa cells ( $\times 100$ ); E, F: Flow cytometry was applied to detect the apoptosis rate of Caski and HeLa cells

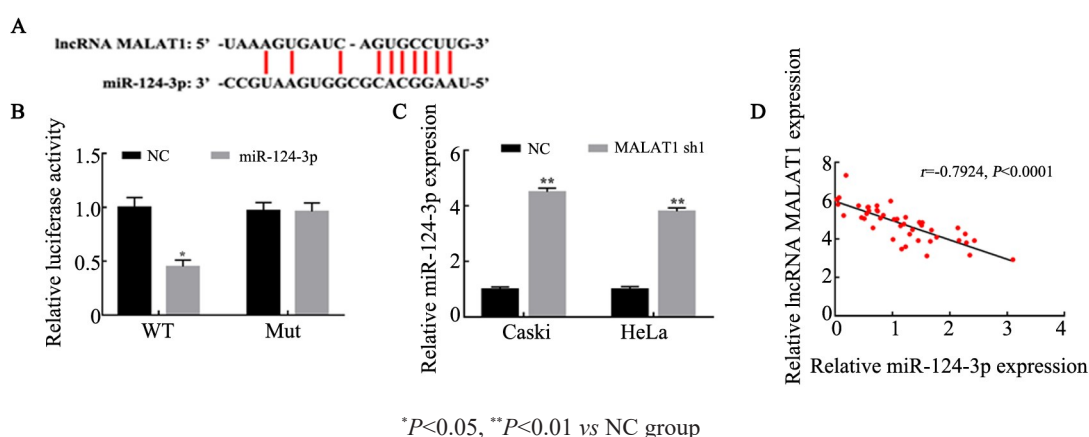
图2 敲降MALAT1对宫颈癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

Fig. 2 Effect of MALAT1 knockdown on proliferation, invasion and apoptosis of cervical cancer cells

### 2.3 MALAT1 通过靶向调控 miR-124-3p 并介导 IGF2BP1 在宫颈癌细胞中的表达

通过 Stabase 2 软件 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 预测 miR-124-3p 可能是 MALAT1 的靶基因, 其预测序列如图 3A 所示。双荧光素酶报告基因验证结果 (图 3B) 显示, 过表达 miR-124-3p 可使荧光素酶活性显著下降 ( $t=5.08, P<0.05$ ), 而共转染 miR-124-3p mimics 和靶向位点发生突变的 pmirGLO-MALAT1-mut 载体, miR-124-3p 对荧光素酶活性的抑制作用丧

失。采用 qPCR 检测 MALAT1 敲降后 miR-124-3p 在宫颈癌细胞系中表达水平, 结果 (图 3C) 显示, MALAT1 敲降后显著促进 miR-124-3p 的表达 ( $t_{\text{Caski}}=-21.71, t_{\text{HeLa}}=-17.71, P<0.01$ )。通过对 45 例宫颈癌患者临床标本进行检测发现, MALAT1 与 miR-124-3p 的表达呈负相关 ( $r=-0.79, P<0.0001$ , 图 3D)。由此可知, miR-124-3p 是 MALAT1 的直接靶基因, 且 MALAT1 可负调控 miR-124-3p 的表达。



A: The bioinformatics analysis result showed that MALAT1 had a binding site with miR-124-3p; B: Dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the relationship between MALAT1 and miR-124-3p; C: qRT-PCR was used to detect the expression of miR-124-3p; D: The Spearman's correlation analysis was used to evaluate the relationship between MALAT1 and miR-124-3p

图3 MALAT1对miR-124-3p表达的调控作用

Fig. 3 Regulation of MALAT1 on miR-124-3p expression

通过借助生物信息学数据库 TargetScan 和 miR-nada 对 miR-124-3p 的靶基因进行了预测, 发现 IGF2BP1 是 miR-124-3p 的候选靶基因, 随后采用荧光素酶报告基因验证实验发现, miR-124-3p 可以结合 IGF2BP1 的 3'UTR (图 4A), 并且 miR-124-3p 可以负调控 IGF2BP1 的表达 ( $t=5.31, P<0.5$ , 图 4B)。采用 qRT-PCR 检测 miR-124-3p 敲降后对 IGF2BP1 mRNA 表达的影响, 结果显示, miR-124-3p 敲降后可显著促进 IGF2BP1 在宫颈癌细胞中的表达水平 ( $t_{\text{Caski}}=-18.00, t_{\text{HeLa}}=-20.58, P<0.01$ , 图 4C)。继而对 45 例宫颈癌患者标本进行检测发现, miR-124-3p 与 IGF2BP1 的表达呈负相关 ( $r=-0.84, P<0.0001$ , 图 4D)。上述实验结果表明, IGF2BP1 是 miR-124-3p 的靶基因, 并且 miR-124-3p 可负调控 IGF2BP1 的表达。

### 2.4 敲降 MALAT1 能够通过上调 miR-124-3p / IGF2BP1 分子轴明显抑制宫颈癌细胞的增殖及侵袭

为了进一步明确 MALAT1 通过靶向下调 miR-124-3p 并上调 IGF2BP1 对宫颈癌 Caski 和 HeLa 细胞增殖、侵袭的影响, 在 Caski 和 HeLa 细胞中分别转染 MALAT1 sh1 和 pcDNA-IGF2BP1 和 miR-124-3p in-

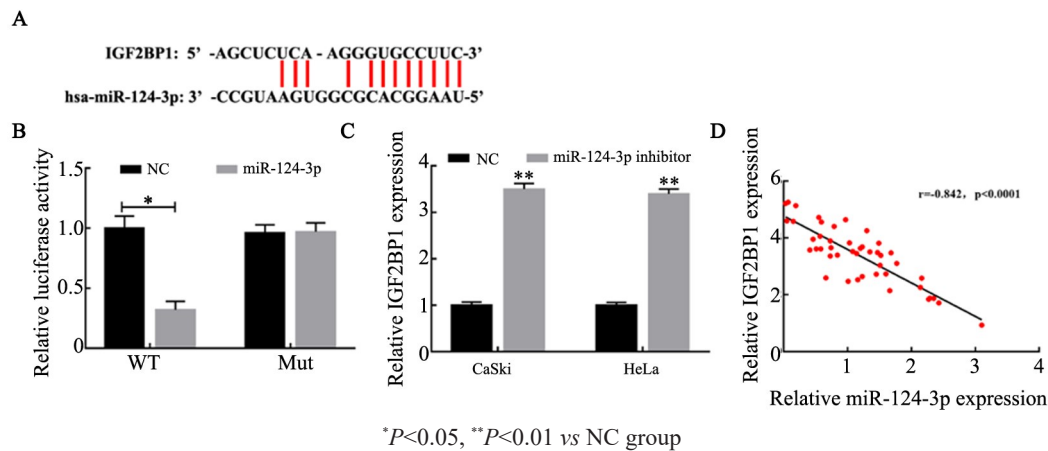
hibitor。q-PCR 检测结果 (图 5A) 证实, 敲降 MALAT1 可显著抑制 IGF2BP1 mRNA 的表达水平 ( $t_{\text{Caski}}=9.18, 6.78, 8.10, t_{\text{HeLa}}=7.38, 4.67, 5.20, P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 而敲降 MALAT1 的同时过表达 IGF2BP1 或敲降 miR-124-3p 的表达能够恢复单独敲降 MALAT1 对 IGF2BP1 的抑制作用。随后, CCK-8 (图 5B) 和 Transwell (图 5C) 检测结果共同证实, 敲降 MALAT1 后显著抑制了 Caski 和 HeLa 细胞的增殖及侵袭能力 ( $t_{\text{Caski}}=2.76, t_{\text{HeLa}}=2.57, P<0.05$  和  $t_{\text{Caski}}=8.90, t_{\text{HeLa}}=9.47, P<0.01$ ), 而同时敲降 miR-124-3p 或过表达 IGF2BP1 则下调了敲降 MALAT1 的抑制作用 ( $t_{\text{Caski}}=-2.00, -2.18, t_{\text{HeLa}}=2.25, 2.30, P<0.05; t_{\text{Caski}}=-10.21, -8.85, t_{\text{HeLa}}=10.27, 9.23, P<0.01$ )。结果表明, 敲降 MALAT1 通过上调 miR-124-3p/IGF2BP1 分子轴而抑制宫颈癌细胞增殖及侵袭。

### 2.5 MALAT1 通过 miR-124-3p/IGF2BP1 分子轴对宫颈癌细胞上皮间质转化的影响

首先采用 Wb 检测 MALAT1 敲降或同时敲降 MALAT1+miR-124-3p 或同时转染 MALAT1 shRNA 和过表达 IGF2BP1 后对 IGF2BP1 表达的影响, 结果

(图6A)显示,与对照组相比,敲降MALAT1可显著抑制IGF2BP1的表达( $P<0.01$ ),但同时转染MALAT1 shRNA+miR-124-3p inhibitor或MALAT1 shRNA+IGF2BP1过表达载体后,IGF2BP1的表达明显高于仅转染MALAT1 shRNA组( $P<0.01$ )。同时,通过免疫荧光检测结果(图6B)发现,敲降MALAT1能够显著上调Caski细胞中上皮标志物E-cadherin的表达水平( $P<0.01$ ),并明显抑制间充质标志物N-cadherin和Vimentin的表达水平( $P<0.01$ )。但同时转染MALAT1 sh1和pcDNA-IGF2BP1或miR-124-3p in-

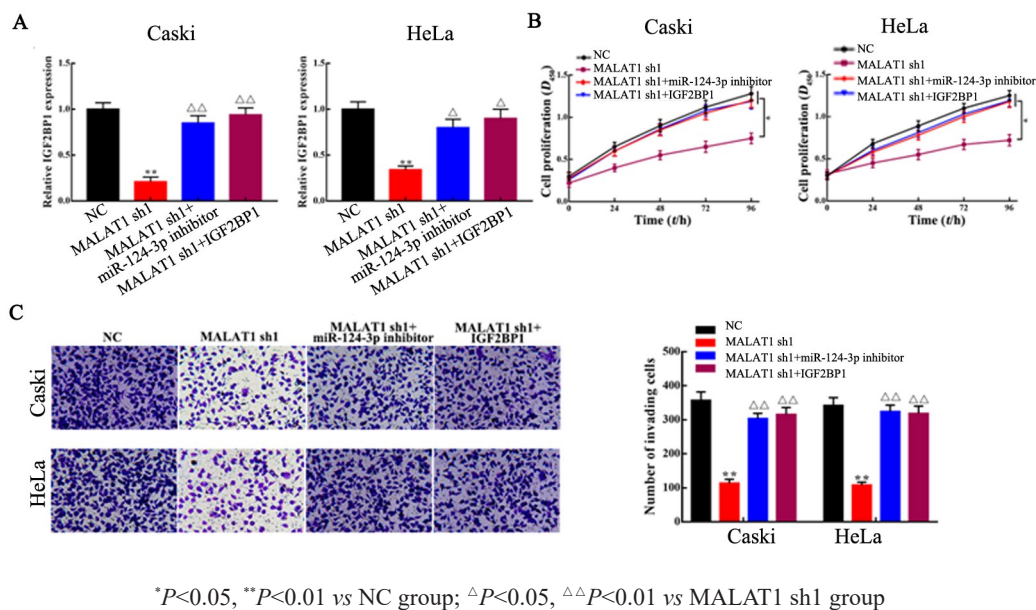
hibitor则与对照组无统计学差异( $P>0.05$ )。此外,Wb检测结果(图6C)显示,敲降MALAT1可显著促进HeLa细胞中N-cadherin和Vimentin的表达( $P<0.01$ ),而E-cadherin的表达则受到明显抑制( $P<0.01$ ),同时敲降miR-124-3p或过表达IGF2BP1则恢复了敲降MALAT1对上皮间质转化相关蛋白的调控作用( $P<0.05$ )。由此可知,敲降MALAT1通过靶向上调miR-124-3p并下调IGF2BP1而抑制宫颈癌Caski和HeLa细胞上皮间质转化。



A: The bioinformatics analysis result showed that miR-124-3p had a binding site with IGF2BP1; B: Dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the relationship between miR-124-3p and IGF2BP1; C: qPCR was used to detect the expression of IGF2BP1; D: The Spearman's correlation analysis was used to evaluate the relationship between IGF2BP1 and miR-124-3p

图4 IGF2BP1是miR-124-3p的靶基因

Fig. 4 IGF2BP1 was a target gene of miR-124-3p

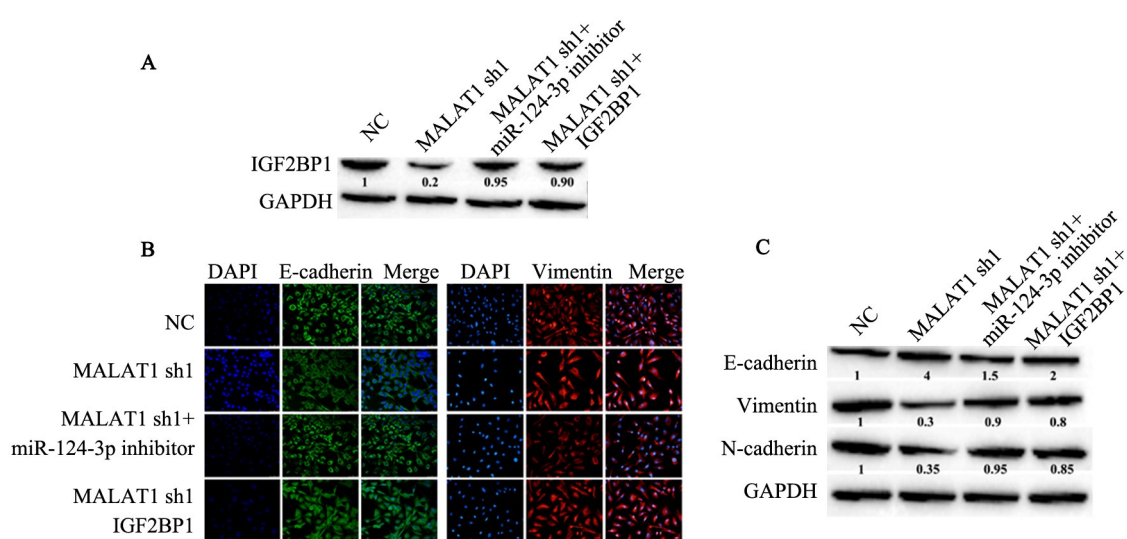


A: qPCR was used to detect the expression of IGF2BP1 in Caski and HeLa cells; B: CCK-8 was used to evaluate the proliferation of Caski and HeLa cells; C: Transwell was used to detect the invasion of Caski and HeLa cells ( $\times 100$ )

图5 MALAT1通过miR-124-3p/IGF2BP1分子轴对宫颈癌细胞生物学行为的影响

Fig. 5 MALAT1 modulates biological behaviors of cervical cancer cells via regulating miR-124-3p/IGF2BP1 axis





A: The expression of IGF2BP1 was detected by western blotting; B: The expression of E-cadherin and Vimentin were detected by Immunofluorescence (×100); C: The expression of E-cadherin, N-cadherin and Vimentin were measured by Western blotting

图6 MALAT1通过miR-124-3p/IGF2BP1分子轴对宫颈癌细胞上皮间质转化相关蛋白的影响

Fig. 6 MALAT1 modulates epithelial mesenchymal transition-related proteins in cervical cancer cells via regulating miR-124-3p/IGF2BP1 axis

### 3 讨论

宫颈癌严重威胁全世界女性健康,临床上主要采用手术和药物来延长宫颈癌生存期,而癌细胞上皮间质转化是临床上导致治疗失效的主要原因<sup>[10]</sup>。为此,寻找多层次调控宫颈癌细胞增殖和转移相关的异常基因表达、信号通路及其分子机制,将有助于识别潜在的宫颈癌治疗靶点,并为制约临床治疗发展提供新的策略。研究<sup>[11]</sup>显示,非编码RNA在宫颈癌的发生发展中扮演着重要的角色,其中lncRNAs生物学功能包括参与表观遗传调控、转录调控、转录后调控、miRNA调控、细胞分化及发育密切相关,其重要机制之一是通过对其周围的相关编码基因的选择性表达发挥调控作用。例如,lncRNA MALAT1在非小细胞肺癌细胞中高表达,敲降lncRNA MALAT1可抑制非小细胞肺癌增殖和促进细胞凋亡<sup>[12]</sup>。同时,过表达lncRNA MALAT1可显著促进胃癌<sup>[13]</sup>、头颈部鳞状细胞癌<sup>[14]</sup>和食管鳞状细胞癌<sup>[15]</sup>细胞的增殖和侵袭能力。上述研究结果为证实lncRNA能够作为宫颈癌的肿瘤标志物提供了前期实验的理论依据,进而可通过研究lncRNA表达水平的差异或某些疾病的特异性lncRNA的表达,来寻找包括宫颈癌在内的多种疾病诊断及治疗的分子标志物。

ZHANG等<sup>[16]</sup>和XIA等<sup>[17]</sup>同样证实lncRNA MALAT1在宫颈癌细胞中高表达。功能研究<sup>[18]</sup>表明,MALAT1基因与多种肿瘤的发生发展及转移相关,其在非小细胞肺癌、肝细胞癌、宫颈癌、膀胱癌以及

结直肠癌等多种肿瘤组织中的表达量升高。为此,本研究通过StarBase数据库分析了可以与lncRNA MALAT1结合的miRNA,发现miR-124-3p是lncRNA MALAT1潜在的靶向作用基因。miRNAs是内源性的小非编码RNA,但与功能基因的表达密切相关<sup>[19]</sup>。miRNA-124在许多肿瘤中表达下调,比如宫颈癌<sup>[20]</sup>、乳腺癌<sup>[21]</sup>、头颈部鳞状细胞癌<sup>[22]</sup>、食管癌<sup>[23]</sup>以及胶质母细胞瘤<sup>[24]</sup>,目前被认为是一个抑癌基因。有研究<sup>[25]</sup>表明,miR-124影响肿瘤细胞增殖、侵袭和转移。miR-124-3p是miR-124家族成员,本实验通过qPCR法检测结果发现,miR-124-3p在宫颈癌组织中的表达明显下调,且与宫颈癌细胞增殖、侵袭和上皮间质转化相关。同时,WANG等<sup>[26]</sup>研究证实,miR-124-3p通过靶向下调IGF2BP抑制宫颈癌细胞增殖和转移。本实验通过生物信息学预测miR-124-3p的靶基因可能为IGF2BP1(癌胚蛋白)。有研究<sup>[27]</sup>证实,IGF2BP1对细胞极化、迁移、增殖和分化具有调控作用,且其在肿瘤中高表达。本研究也同样证实IGF2BP1的表达与miR-124-3p呈负相关。

综上所述,本研究通过细胞实验和临床样本检测充分证实,敲降lncRNA MALAT1通过上调miR-124-3p并下调IGF2BP1进而抑制宫颈癌细胞增殖、侵袭和上皮间质转化以及促进其细胞凋亡,从而缓解宫颈癌发生发展进程。上述分子机制的揭示说明miR-124-3p/IGF2BP1有可能成为宫颈癌细胞分化程度的判定及术后监测的辅助指标。本研究仍存在一些不足之处,如随机样本中没有区分患者分期、是否

经历外科手术治疗以及收集样本量较少, 且为单中心研究, 今后仍需通过临床多中心、大样本和动物实验进一步临床验证。

### [参 考 文 献]

- [1] VARGP J A, BERIWAL S. Image-based brachytherapy for cervical cancer[J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(5):921-930. DOI: 10.5306/wjco.v5.i5.921.
- [2] YU X, YANG Y, LI Y, et al. Baicalein inhibits cervical cancer progression via downregulating long noncoding RNA BDLNR and its downstream PI3K/Akt pathway[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 94: 107-118. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.11.009.
- [3] CHI C, MAO M, SHEN Z, et al. HOXD-AS1 exerts oncogenic functions and promotes chemoresistance in cisplatin-resistant cervical cancer cells[J/OL]. *Hum Gene Ther*, 2018, 2018:Epub ahead of print [2018-09-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29896986>, DOI:10.1089/hum.2017.256.
- [4] SHI D, ZHANG Y, LU R, et al. The long non-coding RNA MALAT1 interacted with miR-218 modulates choriocarcinoma growth by targeting Fbxw8[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97:543-550. DOI:10.1016/j.biopha.2017.10.083.
- [5] KWOK Z H, ROCHE V, CHEW X H, et al. A non-canonical tumor suppressive role for the long non-coding RNA MALAT1 in colon and breast cancers[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(3): 668-678. DOI: 10.1002/ijc.31386.
- [6] JEN J, TANG Y A, LU Y H, et al. Oct4 transcriptionally regulates the expression of long non-coding RNAs NEAT1 and MALAT1 to promote lung cancer progression[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 104. DOI:10.1186/s12943-017-0674-z.
- [7] JI Q, ZHANG L, LIU X, et al. Long non-coding RNA MALAT1 promotes tumour growth and metastasis in colorectal cancer through binding to SFPQ and releasing oncogene PTBP2 from SFPQ/PTBP2 complex[J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(4): 736-748. DOI: 10.1038/bjc.2014.383.
- [8] HU Y R, YU Y C, YOU S W, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates autophagy associated chemoresistance via miR-23b-3p sequestration in gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 174-186. DOI:10.1186/s12943-017-0743-3.
- [9] KLINGE C M. Non-coding RNAs: long non-coding RNAs and microRNAs in endocrine-related cancers[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2018, 25(4):259-282. DOI:10.1530/erc-17-0548.
- [10] GAO J, YANG Y, QIU R, et al. Proteomic analysis of the OGT interactome: novel links to epithelial-mesenchymal transition and metastasis of cervical cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2018, 2018:Epub ahead of print [2018-09-11], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=30052810>. DOI: 10.1093/carcin/bgy097.
- [11] ZHANG A, XU M, MO Y, et al. Role of the lncRNA-p53 regulatory network in cancer[J]. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6(3): 181-91. DOI: 10.1093/jmcb/mju013.
- [12] LI S, MEI Z, HU H B, et al. The lncRNA MALAT1 contributes to non-small cell lung cancer development via modulating miR-124/STAT3 axis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6679-6688. DOI: 10.1002/jcp.26325.
- [13] LI Y, WU Z, YUAN J, et al. Long non-coding RNA MALAT1 promotes gastric cancer tumorigenicity and metastasis by regulating vasculogenic mimicry and angiogenesis[J]. *Cancer Lett*, 2017, 395: 31-44. DOI:10.1016/j.canlet.2017.02.035.
- [14] WANG Y, WU C, ZHANG C, et al. TGF- $\beta$ -induced STAT3 overexpression promotes human head and neck squamous cell carcinoma invasion and metastasis through malat1 / miR-30a interactions[J]. *Cancer Lett*, 2018, 436:52-62. DOI:10.1016/j.canlet.2018.08.009.
- [15] WANG X, LI M, WANG Z, et al. Silencing of long noncoding RNA MALAT1 by miR-101 and miR-217 inhibits proliferation, migration, and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(7):3925-3935. DOI:10.1074/jbc.M114.596866.
- [16] ZHANG L, NIYAZI H E, ZHAO H R, et al. Effects of miRNA-143 and the non-coding RNA MALAT1 on the pathogenesis and metastasis of HeLa cells[J]. *Genet Mol Res*, 2017, 16(1): 1-9. DOI: 10.4238/gmr16019269.
- [17] XIA C, LIANG S, HE Z, et al. Metformin, a first-line drug for type 2 diabetes mellitus, disrupts the MALAT1 / miR-142-3p sponge to decrease invasion and migration in cervical cancer cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 830(7):59-67. DOI:10.1016/j.ejphar.2018.04.027.
- [18] LIU S, JIANG X, LI W, et al. Inhibition of the long non-coding RNA MALAT1 suppresses tumorigenicity and induces apoptosis in the human ovarian cancer SKOV3 cell line[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(6): 3686-3692. DOI:10.3892/ol.2016.4435.
- [19] 张沛, 岳青芬, 侯青霞, 等. 过表达 miR-488-5p 通过靶向 TEM8 降低宫颈癌 C33A 细胞增殖和迁移能力[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(12): 1270-1275. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X. 2018.12.010.
- [20] LI C Y, WANG X N, YAN Z L, et al. The association between polymorphisms in microRNA genes and cervical cancer in a Chinese Han population[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(50): 87914-87927. DOI: 10.18632/oncotarget.21235.
- [21] CAI W L, HUANG W D, LI B, et al. microRNA-124 inhibits bone metastasis of breast cancer by repressing Interleukin-11[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1):9-23. DOI:10.1186/s12943-017-0746-0.
- [22] ZHAO Y, LING Z, HAO Y, et al. MiR-124 acts as a tumor suppressor by inhibiting the expression of sphingosine kinase 1 and its downstream signaling in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15):25005-25020. DOI: 10.18632/oncotarget.15334.
- [23] 刘飞, 刘思桦, 刘世娜, 等. miR-124 通过靶向 BECN1 基因调控细胞自噬抑制食管癌 KYSE170 细胞的侵袭和迁移[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, (8): 778 - 784. DOI: 10.3872 / j. issn. 1007 - 385X. 2018.08.005.
- [24] LI W, HUANG H, SU J, et al. miR-124 Acts as a Tumor Suppressor in Glioblastoma via the Inhibition of Signal Transducer and Activator of Transcription 3[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(4): 2555-2561. DOI:10.1007/s12035-016-9852-z.
- [25] PAPAGIANNAKOPOULOS T, KOSIK K S. MicroRNAs: regulators of oncogenesis and stemness[J]. *BMC Med*, 2008, 6(12):15-19. DOI:10.1186/1741-7015-6-15.
- [26] WANG P, ZHANG L, ZHANG J, et al. MicroRNA-124-3p inhibits cell growth and metastasis in cervical cancer by targeting IGF2BP1[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2):1385-1393. DOI:10.3892/etm.2017.5528.
- [27] HAMMER N A, HANSEN T V, BYSKOV A G, et al. Expression of IGF-II mRNA-binding proteins (IMPs) in gonads and testicular cancer [J]. *Reproduction*, 2005, 130(2):203-212. DOI:10.1530/rep.1. 00664.

[收稿日期] 2018-11-19

[修回日期] 2019-01-17

[本文编辑] 阮芳铭