

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.10.011

· 临床研究 ·

## miR-760 在宫颈鳞状细胞癌组织和细胞中的表达及其对 SiHa 细胞恶性生物学行为的作用

邓振宇<sup>1</sup>, 何传凤<sup>1</sup>, 牛占杰<sup>2</sup> (1. 山东省聊城市妇幼保健院 妇产科, 山东 聊城 252000; 2. 山东省聊城市人民医院 妇产科, 山东 聊城 252000)

**[摘要]** **目的:** 探讨微小 RNA(miR)-760 在人宫颈鳞状细胞癌(CSCC)组织和细胞中的表达及其对 SiHa 细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移、EMT 影响的分子机制。**方法:** 选用 2015 年 4 月至 2018 年 8 月山东省聊城市妇幼保健院妇科手术切除、经病理确诊的 80 例 CSCC 组织及相应的癌旁组织标本和 40 例子宫肌瘤切除术获取的正常宫颈组织标本, 应用 qPCR 检测 CSCC 组织、癌旁组织和正常宫颈组织、人 CSCC 细胞系 SiHa、HCC94 和人宫颈鳞状上皮永生细胞株 H8 中 miR-760 的表达水平, 分析 miR-760 表达与 CSCC 患者临床病理特征的相关性。用脂质体转染法, 将 miR-760 mimics 和 NC-mimics 质粒分别转染至 SiHa 细胞, 用 qPCR 检测 SiHa 细胞中 miR-760 的表达, 用 CCK-8 实验和流式细胞术分别检测 SiHa 细胞增殖能力和凋亡水平, 用 Transwell 实验检测 SiHa 细胞的侵袭和迁移能力, WB 检测 SiHa 细胞 EMT 相关蛋白上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(vimentin)和神经型钙黏蛋白(N-cadherin)的表达变化。用生物学信息法预测 FOXA1 与 miR-760 的靶向关系, 用双荧光素酶报告基因验证 miR-760 对 FOXA1 的直接靶向调控作用。**结果:** CSCC 组织中 miR-760 表达明显低于癌旁组织及正常宫颈组织(均  $P < 0.01$ ), miR-760 表达与患者淋巴结转移和临床分期密切相关(均  $P < 0.01$ )。SiHa、HCC94 细胞中 miR-760 的表达明显低于 H8 细胞(均  $P < 0.01$ )。通过转染 miR-760 mimics 上调 miR-760 表达, 能够显著抑制 SiHa 细胞的增殖能力和侵袭、迁移能力(均  $P < 0.01$ )、促进其凋亡( $P < 0.01$ ), 并上调 E-cadherin 的表达( $P < 0.01$ )、下调 vimentin 和 N-cadherin 的表达(均  $P < 0.01$ )。FOXA1 是 miR-760 的直接靶基因( $P < 0.01$ ), 上调 miR-760 表达显著抑制 SiHa 细胞中 FOXA1 mRNA 和蛋白的表达(均  $P < 0.05$ )。**结论:** 在 CSCC 组织和细胞中 miR-760 低表达, 其通过靶向作用 FOXA1 基因调控 SiHa 细胞的增殖、侵袭、迁移并促进凋亡, 同时影响癌细胞的 EMT 进程。

**[关键词]** 宫颈鳞状细胞癌; SiHa 细胞; miR-760; FOXA1; 增殖; 侵袭; 迁移; 凋亡

**[中图分类号]** R737.33; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)10-1120-08

## Expression of miR-760 in cervical squamous cell carcinoma tissues and cells and its effect on malignant biological behaviors of SiHa cells

DENG Zhenyu<sup>1</sup>, HE Chuanfeng<sup>1</sup>, NIU Zhanjie<sup>2</sup> (1. Department of Obstetrics and Gynecology, Liaocheng Maternal and Child Health Hospital, Liaocheng 252000, Shandong, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252000, Shandong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of microRNA (miR) -760 in human cervical squamous cell carcinoma (CSCC) tissues and cells, and its effects on the proliferation, apoptosis, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of SiHa cells, as well as its molecular mechanism. **Methods:** Eighty pairs of CSCC cancerous and corresponding para-cancerous tissue specimens which were pathologically confirmed and 40 cases of normal cervical tissue specimens obtained by myomectomy in Liaocheng Maternal and Child Health Hospital of Shandong Province from April 2015 to August 2018 were selected. The expression of miR-760 in CSCC tissues, para-cancerous tissues and normal cervical tissues, human CSCC cell lines (SiHa, HCC94) and human cervical squamous epithelial immortalized H8 cells were detected by qPCR, and the relationship between miR-760 and clinicopathological characteristics of CSCC patients was analyzed. miR-760 mimics and NC-mimics plasmids were transfected into SiHa cells by liposome transfection. The expression of miR-760 in SiHa cells was detected by qPCR, the proliferation activity and apoptosis rate were detected by CCK-8 test and flow cytometry, respectively. The invasion and migration of SiHa cells were detected by Transwell assay. The expres-

**[基金项目]** 山东省医药卫生科技发展计划资助项目(No.2016WS0583)。Project supported by Shandong Medical and Health Science and Technology Development Plan Project(No.2016WS0583)

**[作者简介]** 邓振宇(1984-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事妇科疾病的研究, E-mail: dengzhenyufk@yeah.net

**[通信作者]** 何传凤(HE Chuanfeng, corresponding author), 硕士, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤的研究, E-mail: hechuanfeng@163.com

sions of EMT-related proteins, such as E-cadherin, vimentin and N-cadherin, in SiHa cells were detected by WB. Bioinformatics was used to predict the targeting relationship between FOXA1 and miR-760, and double luciferase reporter gene assay was used to verify the direct regulation of miR-760 on FOXA1. **Results:** The expression of miR-760 in CSCC tissues was significantly lower than that in para-cancerous tissues and normal cervical tissues (all  $P < 0.01$ ), and the expression of miR-760 was closely related to lymphnode metastasis and clinical stage (all  $P < 0.01$ ). The expression of miR-760 in SiHa and HCC94 cells was significantly lower than that in H8 cells (all  $P < 0.01$ ). Up-regulation of the expression of miR-760 could significantly inhibit the proliferation, invasion and migration of SiHa cells (all  $P < 0.01$ ), promote apoptosis ( $P < 0.01$ ), up-regulate the expression of E-cadherin protein ( $P < 0.01$ ), and down-regulate the protein expressions of vimentin and N-cadherin (all  $P < 0.01$ ). FOXA1 was a direct target gene of miR-760 ( $P < 0.01$ ). Up-regulation of miR-760 significantly inhibited the mRNA and protein expressions of FOXA1 in SiHa cells (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The expression of miR-760 is down-regulated in CSCC tissues and cells, and it can regulate the proliferation, invasion, migration and apoptosis of CSCC cells by targeting FOXA1.

**[Key words]** cervical squamous cell carcinoma; SiHa cell; miR-760; FOXA1; proliferation; invasion; migration; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(10): 1120-1127. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.10.011]

宫颈癌是世界范围内女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率有逐年升高的趋势<sup>[1]</sup>。尽管手术根治术联合同步放化疗可治愈 80%~90% 的早期宫颈癌患者,但对局部晚期及复发转移的宫颈癌患者而言,其疗效仍不尽如人意,因此寻求更安全、高效的宫颈癌治疗方法是临床关注的热点和难点问题。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类内源性短链非编码 RNA,广泛参与细胞的增殖、分化、衰老、凋亡等功能,与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[2-3]</sup>。既往研究<sup>[4]</sup>表明,许多 miRNA 在宫颈癌的发生进展中发挥着重要作用。最近研究<sup>[5-8]</sup>发现,miR-760 与非小细胞肺癌、结肠癌、卵巢癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤的发生发展密切相关,影响肿瘤细胞的增殖、凋亡及侵袭能力。然而,miR-760 在宫颈癌发生发展中的作用及机制至今尚不清楚。本研究通过检测 miR-760 在宫颈鳞状细胞癌 (cervical squamous cell carcinoma, CSCC) 组织和细胞系中表达及其对 SiHa 细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移和 EMT 的影响,进一步探讨其可能的分子机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 组织标本、细胞系和主要试剂

收集 2015 年 4 月至 2018 年 8 月山东省聊城市妇幼保健院妇产科手术切除的 80 例 CSCC 组织及其对应的癌旁组织标本,所有患者术前均未行放化疗等抗肿瘤治疗,术后经病理学确诊为 CSCC。宫颈癌患者临床分期采用国际妇产科联盟 (FIGO) 的分期标准。另取同期年龄相匹配的 40 例子宫肌瘤行手术切除同时获取的正常宫颈组织作为对照。所有标本取出后 30 min 内置入液氮中,转运至 -80 °C 冰箱保存。手术前均告知患者及其家属并签署知情同意书,研究方案经医院医学伦理委员会批准。

人 CSCC 细胞系 SiHa、HCC94 和宫颈鳞状上皮永生细胞 H8 均购自中国科学院上海细胞库。

TRIzol 试剂购自北京天根生化科技有限公司,

Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司, miR-760 mimics、NC-mimics 购自上海吉玛制药技术有限公司,逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,PCR 引物由上海吉玛制药技术有限公司设计合成。CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司,Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,人工基质胶购自美国 BD 公司,双荧光素酶活性检测试剂盒购自美国 Promega 公司,一抗 FOXA1、GAPDH 和 HRP 标记的二抗山羊抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司,一抗 E-cadherin、vimentin 和 N-cadherin 购自美国 CST 公司。

### 1.2 细胞培养与转染

SiHa、HCC94 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基、H8 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,均置于 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。收集对数生长期 SiHa 细胞接种于 6 孔板中,调整细胞密度至  $2 \times 10^5$  个/孔,按 Lipofectamine™ 2000 说明书操作,分别将 miR-760 mimics 或 NC-mimics 转染至 SiHa 细胞,转染 24 h 后收集各组细胞进行后续实验。

### 1.3 qPCR 检测 CSCC 组织与细胞系中 miR-760 和 FOXA1 mRNA 的表达

取 CSCC 组织标本、细胞系和转染后细胞,参照 TRIzol 试剂说明书提取组织或细胞总 RNA,按逆转录试剂盒参照说明书,将总 RNA 逆转录为 cDNA,取 2 μl cDNA 用 qPCR 试剂盒行 PCR 反应。反应条件: 95 °C 15 min、94 °C 20 s、55 °C 30 s、72 °C 30 s,扩增 45 个循环。引物序列: miR-760 F 为 5'-AGCCGCG-GCTCTGGOTCTG-3', R 为 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'; U6 F 为 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT-3', R 为 5'-CGCTTACGAATTTGCGTGT-CAT-3'; FOXA1 F 为 5'-GCTACTACGCAGACACGCAGGA-3', R 为 5'-GGGTTGGCATAGGACATGTTGA-3'; β-actin F 为 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-

3', R为5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。以U6/ $\beta$ -actin作为内参基因。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-760和FOXA1 mRNA的相对表达水平。

#### 1.4 CCK-8实验检测SiHa细胞的增殖能力

收集各组细胞接种于96孔板中,调整细胞密度至 $5 \times 10^3$ 个/孔,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。每参照CCK-8试剂盒操作说明书操作,每24 h向每孔加入10  $\mu$ l CCK-8溶液,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中避光孵育2 h,酶标仪测定波长450 nm处的光密度(D)值。细胞增殖以D值表示。

#### 1.5 Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术检测SiHa细胞的凋亡水平

应用无EDTA的0.25%的胰蛋白酶消化细胞,轻轻吹打细胞,离心后弃上清液,应用结合缓冲液重悬制备单细胞悬液,后依次加入5  $\mu$ l Annexin V-FITC和2  $\mu$ l PI,混匀后,避光反应15 min后加入适量的结合缓冲液终止反应,立即使用流式细胞仪进行检测,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率=早期细胞凋亡率+晚期细胞凋亡率。

#### 1.6 Transwell实验检测SiHa细胞的侵袭与迁移能力

采用24孔板的Transwell小室进行细胞侵袭及迁移实验。细胞侵袭实验:在上室膜表面均匀预先铺基质胶。收集细胞常规胰蛋白酶消化,用无血清培养液重悬,调整细胞密度为 $2 \times 10^5$ 个/ml,取200 ml细胞悬液加入Transwell上室,下室中加入600 ml含10%FBS的培养基,于37 °C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h后取出小室,棉签小心擦去上室表面的细胞,加入4%多聚甲醛固定细胞30 s,加入1%结晶紫染液室温染色20 min。自然干燥后,于倒置显微镜下观察、拍照,随机选取5个高倍视野,计数穿膜细胞数,取平均细胞数目代表细胞的侵袭能力。细胞迁移实验上室膜表面不预铺基质胶,其余步骤同细胞侵袭实验。

#### 1.7 双荧光素酶报告基因验证FOXA1与miR-760的靶向关系

含有野生型FOXA1基因3'-UTR序列的荧光素酶报告基因质粒(FOXA1-Wt)和含有突变型FOXA1

基因3'-UTR序列的荧光素酶报告基因质粒(FOXA1-Mut)由中国广州锐博生物公司设计合成。收集细胞接种于24孔板中,调整细胞密度至 $2 \times 10^5$ 个/孔,按照Lipofectamine™ 2000说明书操作将FOXA1-Wt质粒(或FOXA1-Mut质粒)与miR-760 mimics或NC-mimics共转染至SiHa细胞,转染后24 h收集各组细胞,采用双荧光素酶活性检测试剂盒检测SiHa细胞的相对荧光素酶活性。相对荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性。

#### 1.8 WB实验检测SiHa细胞miR-760和FOXA1及EMT相关蛋白的表达

收集各组细胞,采用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。取适量蛋白样品上样,SDS-PAGE120 min,湿转法转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h后,加入一抗FOXA1(1:500)、E-cadherin(1:500)、vimentin(1:500)、N-cadherin(1:500)和GAPDH,4 °C孵育过夜,TBST洗膜后,再加入HRP标记的二抗山羊抗兔IgG(1:1000),室温孵育2 h,TBST洗膜后,加入ECL发光剂显影,应用Image J图像分析软件分析蛋白条带的灰度值。

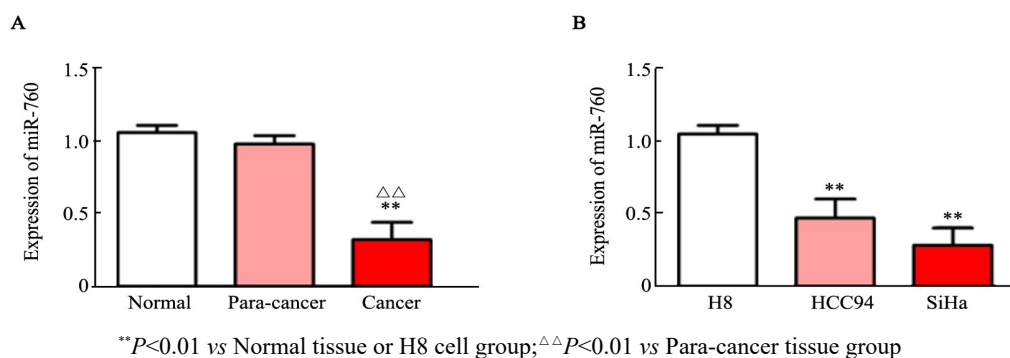
#### 1.9 统计学处理

1.3~1.8实验均重复3次。应用SPSS 19.0统计软件对实验数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料比较采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CSCC组织和细胞系中miR-760呈低表达

qPCR检测结果表明,CSCC组织中miR-760的表达水平明显低于癌旁组织和正常宫颈组织( $t = 44.0、37.4$ ,均 $P < 0.01$ ;图1A);SiHa、HCC94细胞中miR-760的表达水平明显低于H8细胞( $t = 9.9、7.0$ ,均 $P < 0.01$ ;图1B)。结果表明,miR-760低表达可能参与了CSCC的发生过程。



\*\* $P < 0.01$  vs Normal tissue or H8 cell group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs Para-cancer tissue group

图1 CSCC组织(A)和细胞(B)中miR-760呈低表达

Fig.1 Low expression of miR-760 in CSCC tissues (A) and cells (B)

2.2 CSCC组织中miR-760的表达与淋巴结转移和临床分期密切相关

以miR-760的中位值(0.31)水平为截断值,将患者分为miR-760低表达组40例和高表达组40例,分析miR-760与CSCC患者临床病理特征的关系,结果

如表1所示,miR-760低表达与淋巴结转移和临床分期密切相关(均 $P<0.01$ ),而与患者年龄、肿瘤直径、病理分级、间质浸润深度等临床病例特征无关(均 $P>0.05$ )。结果表明,miR-760低表达可能参与了CSCC的发展及转移过程。

表1 CSCC组织中miR-760表达与患者临床病理特征的关系 [n(%)]

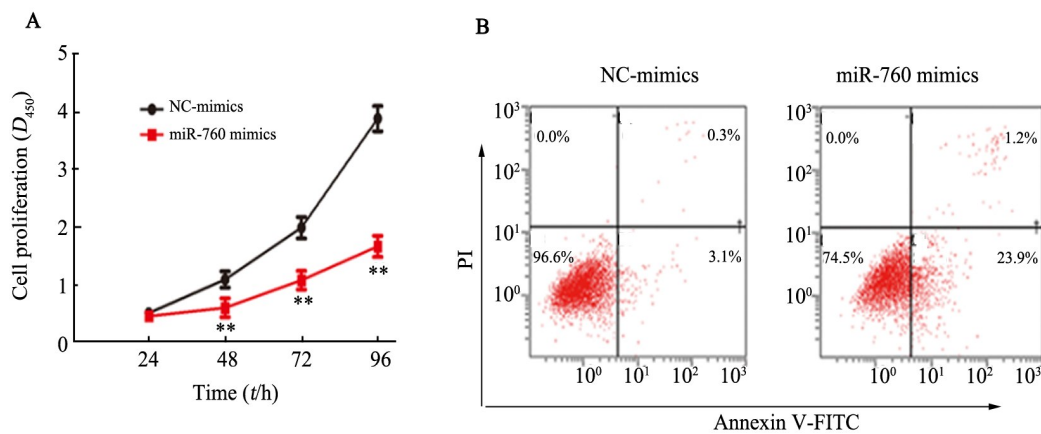
Tab.1 The relationship between the expression of miR-760 and clinicopathological characteristics of CSCC patients [n(%)]

Characteristic	N	Low expression	High expression	$\chi^2$	P
Age( t/a)					
≥45	56	30 (75.0)	26 (65.0)	0.953	0.329
<45	24	10 (25.0)	14 (35.0)		
Tumor diameter( d/cm)					
≥2.5	32	19 (47.5)	13 (32.5)	1.875	0.171
<2.5	48	21 (22.5)	27 (67.5)		
Pathological grade					
G1-G2	62	28 (70.0)	34 (85.0)	2.581	0.108
G3	18	12 (30.0)	6 (25.0)		
Depth of stromal invasion					
≥2/5	58	32 (80.0)	26 (65.0)	2.257	0.133
<2/5	22	8 (20.0)	14 (35.0)		
Clinical stage					
I	50	19 (47.5)	31 (77.5)	7.680	0.006
II	30	21 (42.5)	9 (22.5)		
Lymphatic metastasis					
Yes	21	17 (42.5)	4 (10.0)	10.912	0.001
No	59	23 (47.5)	36 (96.0)		

2.3 转染后SiHa细胞中上调的miR-760抑制细胞的增殖并促进其凋亡

转染miR-760 mimics后,(1)qPCR结果显示,miR-760 mimics组SiHa细胞中miR-760的表达水平明显高于NC-mimics组[(11.57±0.31) vs (1.07±0.05),  $t=57.9, P<0.01$ ],提示转染成功、转染效率较高;(2)CCK-8实验结果(图2A)显示,miR-760 mimics组

SiHa细胞的增殖能力明显低于NC-mimics组( $t=5.3, 6.3, 12.9$ , 均 $P<0.01$ ):(3)流式细胞术检测结果(图2B)显示,miR-760 mimics组SiHa细胞的凋亡率明显高于NC-mimics组[(22.5±2.1)% vs (3.8±0.8)%,  $t=14.4, P<0.01$ ]。结果表明,上调SiHa细胞miR-760的表达能够明显抑制细胞的增殖能力并促进其凋亡。



\*\* $P<0.01$  vs NC-mimics group

图2 上调miR-760对SiHa细胞增殖(A)及凋亡(B)的影响

Fig.1 Effects of up-regulation of miR-760 on proliferation (A) and apoptosis (B) of SiHa cells

2.4 上调miR-760可抑制SiHa细胞的侵袭及迁移能力  
Transwell侵袭和迁移实验结果(图3)显示,上调miR-760后,miR-760 mimics组SiHa细胞的穿膜细

胞数均明显低于NC-mimics组( $t=6.8, 6.1$ ,均 $P<0.01$ )。结果表明,上调miR-760能够明显抑制SiHa细胞的侵袭及迁移能力。

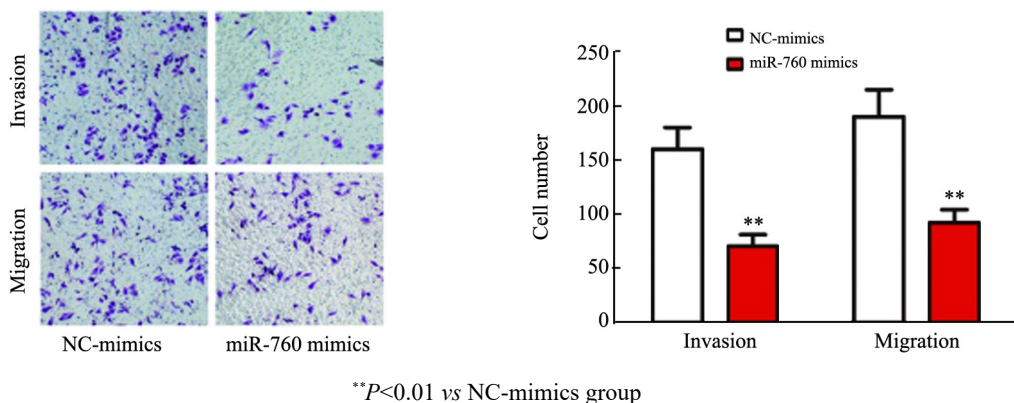


图3 上调miR-760对SiHa细胞的侵袭及迁移能力的影响(结晶紫染色,×200)

Fig.3 Effects of up-regulation of miR-760 on invasion and migration of SiHa cells (crystal violet staining, ×200)

2.5 上调miR-760可抑制SiHa细胞的EMT过程  
WB结果(图4)显示,上调miR-760后,与NC-mimics组比较,miR-760 mimics组E-cadherin的表达水平明显升高( $t=8.2, P<0.01$ ),而vimentin和N-cad-

herin的表达水平明显降低( $t=9.6, 4.6$ ,均 $P<0.01$ )。结果表明,上调miR-760能够明显抑制SiHa细胞的EMT过程。

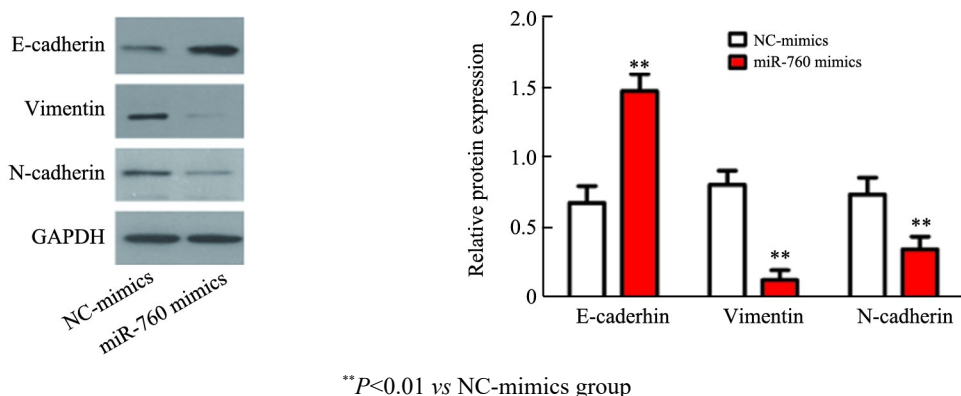


图4 上调miR-760对SiHa细胞EMT进程的影响

Fig.4 Effects of up-regulation of miR-760 on EMT process in SiHa cells

2.6 FOXA1是miR-760的直接靶基因  
应用TargetScan(www.targetscan.org)和miRanda(www.microrna.org)预测FOXA1可能是miR-760的直接作用靶基因,miR-760与FOXA1存在靶向结合位点(图5A)。双荧光素酶活性检测结果(图5B)显示,miR-760可以明显抑制野生型FOXA1-Wt报告载体的荧光素酶活性( $t=10.7, P<0.01$ ),但对突变型FOXA1-Mut报告载体的荧光素酶活性并无抑制作用( $t=1.4, P>0.05$ )。结果表明,miR-760可以特异性的与FOXA1基因3'-UTR序列结合。

mRNA和蛋白的表达  
qPCR和WB结果(图6A、B)显示,上调miR-760后,miR-760 mimics组SiHa细胞中FOXA1 mRNA和蛋白的表达水平明显低于NC-mimics组( $t=3.8, 7.0$ ,均 $P<0.05$ )。结果表明,上调miR-760能够明显抑制SiHa细胞中FOXA1 mRNA和蛋白的表达。

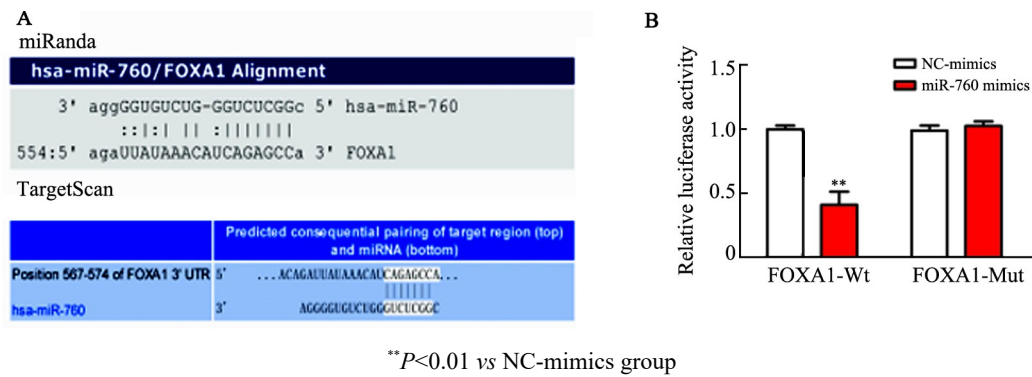
### 3 讨论

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤,以CSCC为主,随着人们生活方式和饮食习惯的不断改变,全球范围内宫颈癌的发病率均有所升高,且有逐渐年轻化

2.7 上调miR-760表达抑制SiHa细胞中FOXA1

的发展趋势。虽然宫颈癌根治手术及同步放化疗技术已日趋成熟,但多数局部晚期及复发转移患者并无法受益,并且长期放化疗所致的毒副反应也不容忽视。近年来越来越多研究<sup>[3,9]</sup>显示,miRNA 在肿瘤发生发展中起重要作用,miRNA 可通过调控靶基因参与信号通路,发挥着类似癌基因或抑癌基因功能。miRNA 的发现为肿瘤发病机制研究提供了新思路,几乎全部肿瘤细胞中均可检测到 miRNA 的异常表达,基于 miRNA 的靶向治疗已成为近年来肿瘤治疗研究的热点。目前在宫颈癌已经发现许多异常表达

的 miRNA 参与了宫颈癌的发生发展<sup>[10-11]</sup>。有研究<sup>[12]</sup>发现,宫颈癌组织和细胞系中 miR-195 的表达水平降低,且其表达与高级别临床分期、淋巴结转移和深层基质侵袭显著相关。研究<sup>[13]</sup>发现,miR-217 在宫颈癌组织中表达降低,作为宫颈癌的抑癌基因发挥作用,并且与宫颈癌细胞对顺铂的耐药性相关。miR-218-5p 能够通过 LYN/NF-κB 通路抑制宫颈癌细胞的增殖和转移<sup>[14]</sup>。但至今仍未找到在宫颈癌发生发展中起到最关键作用的 miRNA。



A: TargetScan and miRanda were used to predict the target gene of miR-760;  
B: Luciferase reporter assay was used to measure luciferase activity

图5 FOXA1 是 miR-760 的直接靶基因  
Fig.5 FOXA1 is a direct target gene of miR-760

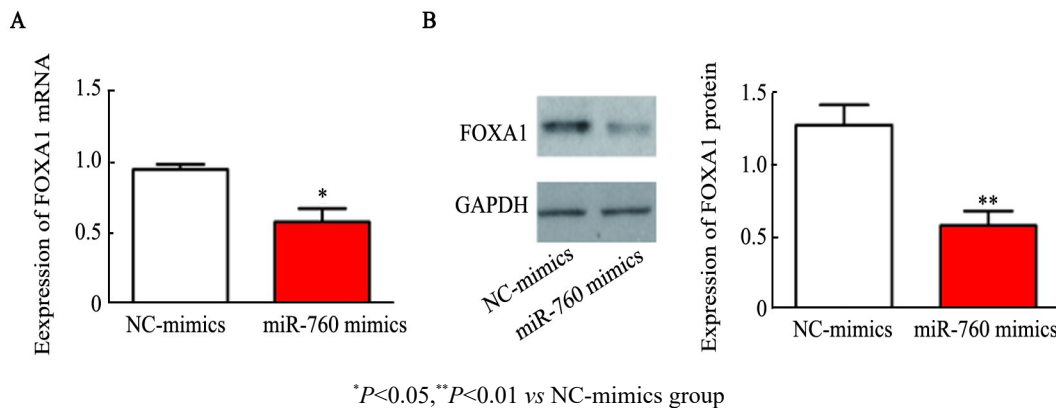


图6 上调 miR-760 对 SiHa 细胞中 FOXA1 mRNA(A)和蛋白(B)表达的影响

Fig.6 Effects of up-regulation of miR-760 on the mRNA (A) and protein (B) expressions of FOXA1 in SiHa cells

miR-760 是近年来新发现的 miRNA 家族重要成员之一,其在多种恶性肿瘤中表达异常,可能作为癌基因或者抑癌基因发挥作用。miR-760 在结肠癌患者血清中表达下调,其与晚期结肠癌的分期呈负相关,ROC 曲线显示血清 miR-760 水平对结肠癌有较高的诊断价值<sup>[15]</sup>。miR-760 在结肠癌组织中表达明显下调,并且 miR-760 的低表达与患者的不良预后密切相关,上调 miR-760 表达能够通过调控 BATF3/AP-1/cyclinD1 信号通路抑制癌细胞的增殖<sup>[6]</sup>。在肝细胞癌

细胞中也发现 miR-760 表达水平降低,并且 miR-760 能够通过 Notch1/Hes1-PTEN/AKT 细胞通路抑制肝细胞癌细胞对多柔比星的化疗抵抗<sup>[6]</sup>。在非小细胞肺癌<sup>[5]</sup>、乳腺癌<sup>[8]</sup>中也发现 miR-760 表达水平下降,作为抑癌基因发挥作用。但也有研究<sup>[7]</sup>发现,miR-760 在卵巢癌组织和细胞中表达升高,作为癌基因发挥作用,能够促进癌细胞的增殖,说明 miR-760 具有较强的异质性,在不同的肿瘤中可能通过不同的上下游分子通路起着不同的作用。本研究发现,CSCC 组

组织中 miR-760 表达水平明显低于癌旁组织和正常宫颈组织, 在 CSCC 的 SiHa、HCC94 细胞中的表达水平也明显降低, 提示 miR-760 可能在 CSCC 的发生中起着抑癌基因的作用; miR-760 低表达与淋巴结转移和临床分期密切相关, 提示 miR-760 表达降低可能促进了 CSCC 的进展及转移。

无限增殖和侵袭转移是恶性肿瘤细胞的基本生物学特性, 为了进一步探索 miR-760 在宫颈癌可能的作用机制, 本研究通过 CCK-8 实验和细胞凋亡实验发现, 上调 SiHa 细胞 miR-760 的表达能够明显抑制细胞的增殖能力并促进其凋亡; Transwell 侵袭实验显示随着 SiHa 细胞 miR-760 表达水平的升高, 细胞的侵袭和迁移能力明显降低。进一步证实, miR-760 在 CSCC 的发生发展中作为抑癌基因发挥作用, 抑制癌细胞的增殖和转移。EMT 是上皮细胞获得间质细胞特性的过程, 在肿瘤细胞的侵袭和迁移中激活 EMT, 是肿瘤细胞获得侵袭性的关键分子事件<sup>[17]</sup>。E-cadherin、vimentin 和 N-cadherin 是 EMT 过程中重要的标志性蛋白, 肿瘤细胞 EMT 相关蛋白的异常表达是 EMT 激活的标志<sup>[18]</sup>。本研究发现, 上调 SiHa 细胞 miR-760 的表达能够明显上调上皮性标志物 E-cadherin 的表达, 同时下调间质性标志蛋白 vimentin 和 N-cadherin 的表达, 进一步证实了在 CSCC 的发生进展中, miR-760 能够通过抑制 EMT 过程起着抑癌基因的作用。

为了深入探讨 miR-760 对 CSCC 细胞肿瘤生物学特性影响作用的下游分子机制, 本实验通过生物学信息法预测 FOXA1 可能是 miR-760 的直接作用靶基因。因为 miR-760 与 FOXA1 存在靶向结合位点, 双荧光素酶活性检测结果显示, miR-760 可以特异性的与 FOXA1 基因 3'-UTR 序列结合, 从而抑制野生型 FOXA1-Wt 报告载体的荧光素酶活性, 但对突变型 FOXA1-Mut 报告载体的荧光素酶活性并无抑制作用。qPCR 和 WB 结果也发现, 上调 SiHa 细胞 miR-760 的表达能够明显抑制细胞中 FOXA1 mRNA 和蛋白的表达, 进一步证实 FOXA1 是 miR-760 的直接作用靶基因。LI 等<sup>[19]</sup>近期报道, miR-760 能够通过靶向 FOXA1 抑制胶质瘤的发生发展。ZHANG 等<sup>[20]</sup>在研究中证实, miR-760 能够通过靶向调控 FOXA1 增强非小细胞肺癌细胞对 TNF 相关凋亡诱导配体的敏感性。FOXA1 是叉头框家族蛋白重要成员之一, 其基因定位于人类 14q21.1 染色体上, FOXA1 可以与 DNA 修复复合物结合, 从而影响 DNA 损伤的修复<sup>[21]</sup>。研究<sup>[22]</sup>显示, FOXA1 与恶性肿瘤关系密切。KARPATHIU 等<sup>[23]</sup>通过免疫组化发现, FOXA1 在宫颈癌组织中强表达。GU 等<sup>[24]</sup>也证实, FOXA1 在宫颈

癌组织中表达增高, 下调 FOXA1 表达能明显抑制宫颈癌细胞的增殖和转移及 EMT 过程, 并促进肿瘤细胞的凋亡。以上结果提示, miR-760 通过靶向 FOXA1 从而抑制 SiHa 细胞的增殖和侵袭迁移, 并促进其凋亡, 在 CSCC 的发生发展中起着抑癌基因的作用。

综上所述, 本研究证实 miR-760 在 CSCC 组织和细胞中低表达。miR-760 通过靶向作用 FOXA1 从而抑制 CSCC 细胞的增殖、侵袭和迁移, 并促进其凋亡, 为宫颈癌的靶向治疗提供了新的研究方向。

### [参考文献]

- [1] 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: Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] JI W D, SUN B, SU C Q. Targeting microRNAs in cancer gene therapy[J/OL]. Genes (Basel), 2017, 8(1): E21[2019-05-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5295016/>. DOI: 10.3390/genes8010021.
- [3] DI LEVA G, GAROFALO M, CROCE C M. MicroRNAs in cancer[J/OL]. Annu Rev Pathol, 2014, 9: 287-314[2019-05-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009396/>. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012513-104715.
- [4] WANG J Y, CHEN L J. The role of miRNAs in the invasion and metastasis of cervical cancer[J/OL]. Biosci Rep, 2019, 39(3): BSR20181377 [2019-05-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6418402/>. DOI:10.1042/BSR20181377.
- [5] YAN C H, ZHANG W, SHI X D, et al. MiR-760 suppresses non-small cell lung cancer proliferation and metastasis by targeting ROS1[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(19): 18385-18391. DOI:10.1007/s11356-017-1138-0.
- [6] CAO L, LIU Y L, WANG D, et al. MiR-760 suppresses human colorectal cancer growth by targeting BATF3/AP-1/cyclinD1 signaling[J/OL]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 83[2019-05-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5902951/>. DOI: 10.1186/s13046-018-0757-8.
- [7] LIAO Y B, DENG Y L, LIU J, et al. MiR-760 overexpression promotes proliferation in ovarian cancer by downregulation of PHLPP2 expression[J]. Gynecol Oncol, 2016, 143(3): 655-663. DOI:10.1016/j.ygyno.2016.09.010.
- [8] HAN M L, WANG F, GU Y T, et al. MicroR-760 suppresses cancer stem cell subpopulation and breast cancer cell proliferation and metastasis: By down-regulating NANOG[J]. Biomedicine Pharmacother, 2016, 80: 304-310. DOI:10.1016/j.biopha.2016.03.024.
- [9] 耿石磊, 王熙才, 陈艳. miR-32 在恶性肿瘤发生发展中的作用及其机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(10): 1064-1071. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.10.015.
- [10] GONZÁLEZ-QUINTANA V, PALMA-BERRÉ L, CAMPOS-PARRA A D, et al. MicroRNAs are involved in cervical cancer development, progression, clinical outcome and improvement treatment response (Review)[J]. Oncol Rep, 2016, 35(1): 3-12. DOI:10.3892/or.2015.4369.

- [11] RAO Q X, SHEN Q L, ZHOU H, et al. Aberrant microRNA expression in human cervical carcinomas[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2): 1242-1248. DOI:10.1007/s12032-011-9830-2.
- [12] ZHOU Q, HAN L R, ZHOU Y X, et al. MiR-195 suppresses cervical cancer migration and invasion through targeting Smad3[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2016, 26(5): 817-824. DOI: 10.1097/igc.0000000000000686.
- [13] YIN Z J, REN W R. MicroRNA-217 acts as a tumor suppressor and correlates with the chemoresistance of cervical carcinoma to cisplatin [J]. *Oncotargets Ther*, 2019, 12: 759-771. DOI:10.2147/ott.s176618.
- [14] XU Y S, HE Q, LU Y Y, et al. MicroRNA-218-5p inhibits cell growth and metastasis in cervical cancer via LYN/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 198. DOI:10.1186/s12935-018-0673-1.
- [15] ELSHAFEI A, SHAKER O, ABD EL-MOTAAL O, et al. The expression profiling of serum miR-92a, miR-375, and miR-760 in colorectal cancer: an Egyptian study[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): 1010428317705765. DOI:10.1177/1010428317705765.
- [16] TIAN T, FU X, LU J, et al. MicroRNA-760 inhibits doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma through regulating Notch1 / Hes1-PTEN/akt signaling pathway[J/OL]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2018, 32(8): e22167[2019-05-03]. [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1099-0461](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1099-0461). DOI:10.1002/jbt.22167.
- [17] KATSUNO Y, LAMOUILLE S, DERYNCK R. TGF- $\beta$  signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression[J]. *Curr Opin Oncol*, 2013, 25(1): 76-84. DOI:10.1097/CCO.0b013e32835b6371.
- [18] VOULGARI A, PINTZAS A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 75-90. DOI:10.1016/j.bbcan.2009.03.002.
- [19] LI Q, LU J L, XIA J, et al. Long non-coding RNA LOC730100 enhances proliferation and invasion of glioma cells through competitively sponging miR-760 from FOXA1 mRNA[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 512(3): 558-563. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.03.124.
- [20] ZHANG X, WANG L, LIU Y, et al. MiR-760 enhances TRAIL sensitivity in non-small cell lung cancer via targeting the protein FOXA1[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2018, 99: 523-529. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.076.
- [21] ZHANG Y, ZHANG D, LI Q, et al. Nucleation of DNA repair factors by FOXA1 links DNA demethylation to transcriptional pioneering[J]. *Nat Genet*, 2016, 48(9): 1003-1013. DOI:10.1038/ng.3635.
- [22] KATO H, IGARASHI M, FUKUDA H, et al. Cancer genetics and genomics of human FOX family genes[J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(2): 198-206. DOI:10.1016/j.canlet.2012.09.017.
- [23] KARPATHIU G, DA CRUZ V, CASTEILLO F, et al. FOXA1 in HPV associated carcinomas: its expression in carcinomas of the head and neck and of the uterine cervix[J]. *Exp Mol Pathol*, 2017, 102(2): 230-236. DOI:10.1016/j.yexmp.2017.02.010.
- [24] GU F, LI Z H, WANG C Q, et al. Effects of forkhead Box protein A1 on cell proliferation regulating and EMT of cervical carcinoma [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(21): 7189-7196. DOI: 10.26355/eurrev\_201811\_16252.

[收稿日期] 2019-05-05

[修回日期] 2019-08-22

[本文编辑] 党瑞山