

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.07.002

· 基础研究 ·

## lncRNA MEG3 通过 miR-9-5p/SOCS5 轴对宫颈癌细胞恶性生物学行为的影响

张艳<sup>1a</sup>, 李封<sup>1b</sup>, 徐婉<sup>2</sup>, 张莉<sup>1a</sup>, 段亚亭<sup>1a</sup>, 余作琼<sup>1a</sup> (1. 重庆市中医院 a. 妇科, b. 肿瘤科, 重庆 400011; 2. 解放军总医院 第七医学中心, 北京 100039)

**[摘要]** **目的:** 探讨 lncRNA 母源性印记基因 3 (maternal imprinting gene 3, MEG3) 通过 miR-9-5p/SOCS5 轴对宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的调控作用。**方法:** 收集 2017 年 1 月至 2019 年 6 月重庆市中医院手术切除的 20 例宫颈癌患者的癌及癌旁组织标本; 利用脂质体转染技术分别将 pcDNA3.1-MEG3、si-MEG3、miR-9-5p mimics、miR-9-5p inhibitor 及其对照质粒等转染进宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞, 构建过表达和沉默细胞模型。用 qPCR 检测宫颈癌组织及细胞模型中 MEG3、miR-9-5p 和 SOCS5 表达水平, 用 CCK-8 法、Transwell 小室法检测细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 用细胞免疫荧光实验检测细胞中 E-cadherin 和 vimentin 表达水平。通过在线生物信息学 TargetScan 数据库预测靶基因, 用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-9-5p 分别与 MEG3 和 SOCS5 的靶向关系。**结果:** 分别与癌旁组织和宫颈上皮 HcerEpic 细胞比较, 宫颈癌组织和细胞系中 MEG3 和 SOCS5 表达显著下调、miR-9-5p 表达显著上调 (均  $P < 0.01$ )。TargetScan 数据库分析和双荧光素酶报告基因实验证实 miR-9-5p 与 MEG3 或 SOCS5 存在靶向关系。MEG3 和 SOCS5 显著抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移与侵袭能力 (均  $P < 0.01$ ), miR-9-5p 显著提高细胞的增殖、迁移与侵袭能力 (均  $P < 0.01$ )。MEG3 和 SOCS5 促进 E-cadherin 表达、抑制 vimentin 表达; miR-9-5p 抑制 E-cadherin 表达、促进 vimentin 表达 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论:** lncRNA MEG3 通过 miR-9-5p/SOCS5 分子轴调控宫颈癌细胞的增殖、迁移、侵袭与 EMT 进程。

**[关键词]** lncRNA 母源性印记基因 3; miR-9-5p/SOCS5 轴; 宫颈癌; HeLa 细胞; SiHa 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭; 上皮间质转化

**[中图分类号]** R737.33; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)07-0725-10

## Effect of lncRNA MEG3 on the malignant biological behaviors of cervical cancer cells via miR-9-5p/SOCS5 axis

ZHANG Yan<sup>1a</sup>, LI Feng<sup>1b</sup>, XU Wan<sup>2</sup>, ZHANG Li<sup>1a</sup>, DUAN Yating<sup>1a</sup>, YU Zuoqiong<sup>1a</sup> (1a. Department of Gynaecology, 1b. Department of Oncology, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400011, China; 2. 7th Medical Center, General Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

**[Abstract] Objective:** To explore the regulatory effect of lncRNA maternal imprinting gene 3 (MEG3) on proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cervical cancer cells via miR-9-5p/SOCS5 axis. **Methods:** A total of 20 pairs of cancer and para-cancerous tissue specimens resected from cervical cancer patients in Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine from January 2017 to June 2019 were collected for this study. Using liposome transfection technology, pcDNA3.1-MEG3, si-MEG3, miR-9-5p mimics, miR-9-5p inhibitor and their control plasmids were transfected into cervical cancer HeLa and SiHa cells respectively to construct overexpression and silence cell model. qPCR was used to detect the expression levels of MEG3, miR-9-5p and SOCS5 in cervical cancer tissues and cell lines. CCK-8 method and Transwell chamber method were used to detect cell proliferation, migration and invasion ability. The expression levels of E-cadherin and vimentin in cells were detected by cellular immunofluorescence experiments. Target genes were predicted through the Online Bioinformatics TargetScan database. Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between miR-9-5p and MEG3, SOCS5, respectively. **Results:** Compared with para-cancerous tissues and cervical epithelial HcerEpic cells, the expressions of MEG3 and SOCS5 were significantly down-regulated and the expression of miR-9-5p was significantly up-regulated in cervical cancer tissues and cell lines (all  $P < 0.01$ ). TargetScan

**[基金项目]** 国家重点研发计划资助项目 (No. 2018YFC1704104)。Project supported by the Key Research and Development Program of China (No. 2018YFC1704104)

**[作者简介]** 张艳 (1985-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤的治疗研究, E-mail: 376639795@qq.com

**[通信作者]** 李封 (LI Feng, corresponding author), 硕士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤的靶向治疗, E-mail: xin29209234@163.com

database analysis and Dual luciferase reporter gene assay confirmed the targeting relationship between miR-9-5p and MEG3 or SOCS5. MEG3 and SOCS5 significantly inhibited while miR-9-5p significantly promoted cell proliferation, migration and invasion ability (all  $P < 0.01$ ). MEG3 and SOCS5 promoted E-cadherin expression and inhibited vimentin expression, while miR-9-5p inhibited E-cadherin expression and promoted vimentin expression ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** lncRNA MEG3 regulates proliferation, migration, invasion and EMT of cervical cancer cells via miR-9-5p/SOCS5 axis.

**[Key words]** lncRNA MEG3; miR-9-5p/SOCS5 axis; cervical cancer; HeLa cell; SiHa cell; proliferation; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(7): 725-734. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.07.002]

宫颈癌是女性中发病率居第2位、病死率居第3位的恶性肿瘤,其中发展中国家的宫颈癌病死率为52%<sup>[1]</sup>。尽管放疗和手术在治疗早期浸润性宫颈癌局部复发风险的方面取得了出色的疗效,但是患者的预后仍不能令人满意<sup>[2]</sup>。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)母源性印记基因3(maternal imprinting gene 3, MEG3)在多种肿瘤(如乳腺癌、血管瘤、胆囊癌)中起抑癌作用<sup>[3-5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>证实,MEG3在宫颈癌中低表达。miRNA通过与mRNA的3'-UTR互补碱基配对并触发翻译抑制或RNA降解,参与基因表达的调控<sup>[7-8]</sup>。miR-9-5p作为人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的特异性抗体,可诱发宫颈癌<sup>[9]</sup>。细胞因子信号转导抑制因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)蛋白家族成员在细胞因子信号转导的调控中起关键作用。研究<sup>[10]</sup>发现,SOCS5在癌细胞中低表达,并且可能在抑制肿瘤生长和血管生成中起作用。本研究通过检测MEG3、miR-9-5p和SOCS5在宫颈癌组织和细胞系中的表达,探讨MEG3、miR-9-5p和SOCS5的相互潜在关系以及MEG3/miR-9-5p/SOCS5轴对宫颈癌细胞增殖、侵袭、迁移和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本、细胞系及主要试剂

收集2017年1月至2019年6月重庆市中医院接受宫颈癌切除手术的20例宫颈癌患者的癌及配对的癌旁组织标本,经病理确诊为宫颈癌。患者年龄36~68岁,中位年龄51岁;其中宫颈腺癌10例,宫颈鳞癌10例;HPV感染19例,无HPV感染1例。所有患者均未在手术前进行化疗,术前均签署了知情同意书,研究方案获得所在医院伦理委员会的批准。

人宫颈癌细胞系HeLa和SiHa及人正常宫颈上皮细胞株HcerEpic购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

RPMI 1640培养基、MEM培养基、胎牛血清和CCK-8试剂盒均购自美国Gibco公司,TRIzol试剂、cDNA逆转录试剂盒和SYBR Premix EX Taq™试剂盒购自日本TaKaRa公司,阴性对照(NC)、miR-9-5p mimics、miR-9-5p

inhibitor由Genepharma公司合成,pcDNA3.1-Ctrl、pcDNA3.1-MEG3si-Ctrl、si-MEG3和Lipofectamine™3000购自美国Invitrogen公司,pmirGLO载体、双荧光素酶活性检测试剂盒和Transwell小室购自美国Promega公司,E-cadherin、vimentin一抗和荧光标记的山羊抗兔IgG抗体和山羊抗鼠IgG抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司。

### 1.2 细胞培养及转染

HcerEpic细胞用含10%胎牛血清的MEM培养基培养,HeLa和SiHa细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>的培养箱,2 d更换1次培养基。取对数生长期细胞进行后续实验。

细胞转染:按照Lipofectamine™3000转染试剂说明书的方法将50 ng的pcDNA3.1-Ctrl、pcDNA3.1-MEG3、si-Ctrl和si-MEG3及100 nmol/L的NC、miR-9-5p mimics、miR-9-5p inhibitor分别转入HeLa和SiHa细胞中,培养6 h后更换新的培养基继续培养,48 h后结束培养,收集各组细胞进行后续实验。

### 1.3 qPCR检测宫颈癌组织和细胞系中MEG3、miR-9-5p和SOCS5的表达水平

用TRIzol试剂提取宫颈癌组织和细胞中总RNA。用Nanodrop 2000仪器测量样品总RNA浓度,并将每个配对的样品调节至相同浓度。然后按照cDNA逆转录试剂盒将总RNA逆转录成cDNA。使用SYBR Premix EX Taq™试剂盒进行qPCR。PCR反应条件:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 30 s,共40个循环。qPCR的引物序列如表1所示。使用FTC-3000p实时PCR系统完成实验后,以U6和β-actin分别用作MEG3、miR-9-5p和SOCS5的内参,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法分析计算目的基因mRNA的相对表达水平。

### 1.4 CCK-8法检测HeLa和SiHa细胞的增殖能力

将转染后各组HeLa和SiHa细胞分别以2×10<sup>4</sup>个/孔的密度接种到96孔板,培养24、48、72和96 h后,将10 μl CCK-8溶液添加到每个孔中,并在37℃下孵育2 h。后用自动酶标仪检测波长在450 nm处的光密度(D)值来检测HeLa和SiHa细胞的增殖能力。

表1 PCR引物序列  
Tab.1 Primer sequences for PCR

Primer	Sequence(5'-3')
MEG3	F:CTGCCCATCTACACCTCACG
	R:CTCTCCGCCGTCTGCGCTAGGGGCT
miR-9-5p	F:GTGCAGGGTCCGAGGT
	R:GCGCTCTTTGGTTATCTAGC
SOCS5	F:ATTGATGGGCTCCCTCTACCC
	R:TGCCTTGACTGGTTCTCGTTCC
U6	F:GGAAGGACTCATGACCACAGTCC
	R:TCGCTGTGAAGTCAGAGGAGACC
$\beta$ -actin	F:CAACGAATTTGGCTACAGCA
	R:AGGGGTCTACATGCAACTG

### 1.5 Transwell小室法检测HeLa和SiHa细胞的迁移和侵袭能力

在200  $\mu$ l无血清培养基中将 $2 \times 10^4$ 个HeLa和SiHa细胞分别接种到Transwell上小室中,将600  $\mu$ l完全培养基添加到Transwell下小室中。培养48 h后,将细胞用4%多聚甲醛固定后,用结晶紫染色20 min。在显微镜下,随机选择5个区域计数迁移细胞数,然后取平均值。细胞侵袭实验方法除了在Transwell上小室预铺基质胶外,其余操作方法同迁移实验。

### 1.6 细胞免疫荧光染色实验检测HeLa和SiHa细胞中E-cadherin和vimentin的表达

取转染后各组HeLa和SiHa细胞,并将24 mm $\times$ 24 mm的无菌盖玻片置于培养皿上培养48 h后,取出盖玻片。然后,将盖玻片上的细胞在室温下用4%多聚甲醛溶液固定20 min,10%山羊血清密封15 min,加入E-cadherin(1:500)、vimentin(1:500)一抗,4  $^{\circ}$ C下孵育过夜。次日,将细胞在37  $^{\circ}$ C的培养箱中孵育45 min后,加入山羊抗兔IgG二抗(1:2 000)或山羊抗鼠IgG二抗(1:2 000),在暗室孵育2 h后,将细胞在

在暗室条件下用DAPI染色5 min,中性树脂封片,荧光显微镜下观察并计算HeLa和SiHa细胞E-cadherin和vimentin阳性表达率(阳性表达率=阳性细胞数/10HPF $\times$ 100%)。

### 1.7 双荧光素酶报告基因实验验证miR-9-5p与MEG3和SOCS5的靶向关系

通过TargetScan数据库分析miR-9-5p分别与MEG3和SOCS5的非编码区域的结合位点。将MEG3 3'UTR野生型/突变型(WT/MUT)或SOCS5 3'UTR WT/MUT克隆到pmirGLO载体中,然后分别将NC、miR-9-5p mimics、miR-9-5p inhibitor、pmirGLO-MEG3-WT、pmirGLO-MEG3-MUT、pmirGLO-SOCS5-WT或pmirGLO-SOCS5-MUT转染至HeLa细胞或SiHa细胞中。48 h后,应用双荧光素酶活性检测试剂盒的方法测定细胞的荧光素酶活性。

### 1.8 统计学处理

1.3~1.7实验均重复3次。采用SPSS 19.0软件对实验数据进行统计学分析。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 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;率的比较采用 $\chi^2$ 检验;Pearson相关分析用于分析miR-9-5p与lncRNA MEG3或SOCS5之间的关系。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MEG3在宫颈癌组织和细胞系中低表达

qPCR检测结果(图1)显示,宫颈癌组织中MEG3表达水平显著低于癌旁组织( $t=17.32, P < 0.01$ ;图1A);在HeLa和SiHa细胞中MEG3表达水平显著低于HcerEpic细胞( $F=18.45, P < 0.01$ ;图1B)。实验结果表明,MEG3在宫颈癌组织和细胞系中低表达。

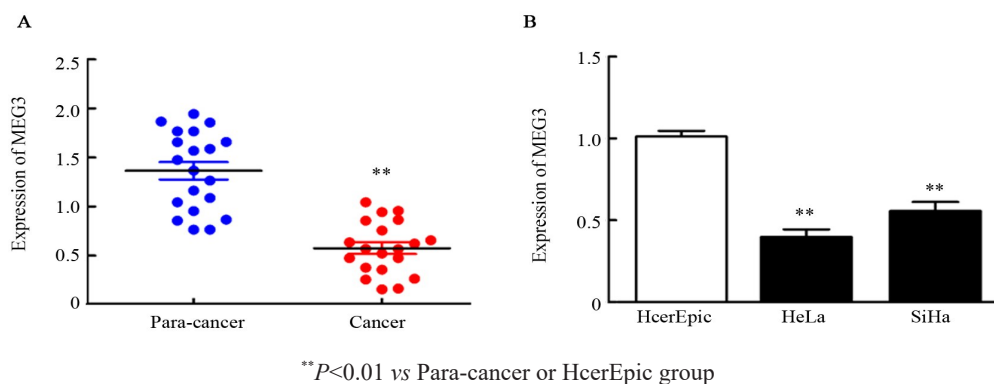


图1 MEG3在宫颈癌组织(A)和细胞系(B)中的表达

Fig.1 Expression of MEG3 in cervical cancer tissues (A) and cell lines (B)

### 2.2 MEG3抑制宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭与EMT进程

qPCR检测结果显示,转染pcDNA3.1-MEG3后,

HeLa细胞中MEG3表达水平显著上调( $1.56 \pm 0.12$  vs  $1.00 \pm 0.08, t=16.23, P < 0.01$ );转染si-MEG3后,

SiHa 细胞中 MEG3 表达水平显著下调 ( $0.42 \pm 0.11$  vs  $1.00 \pm 0.04$ ,  $t=15.12$ ,  $P<0.01$ )。

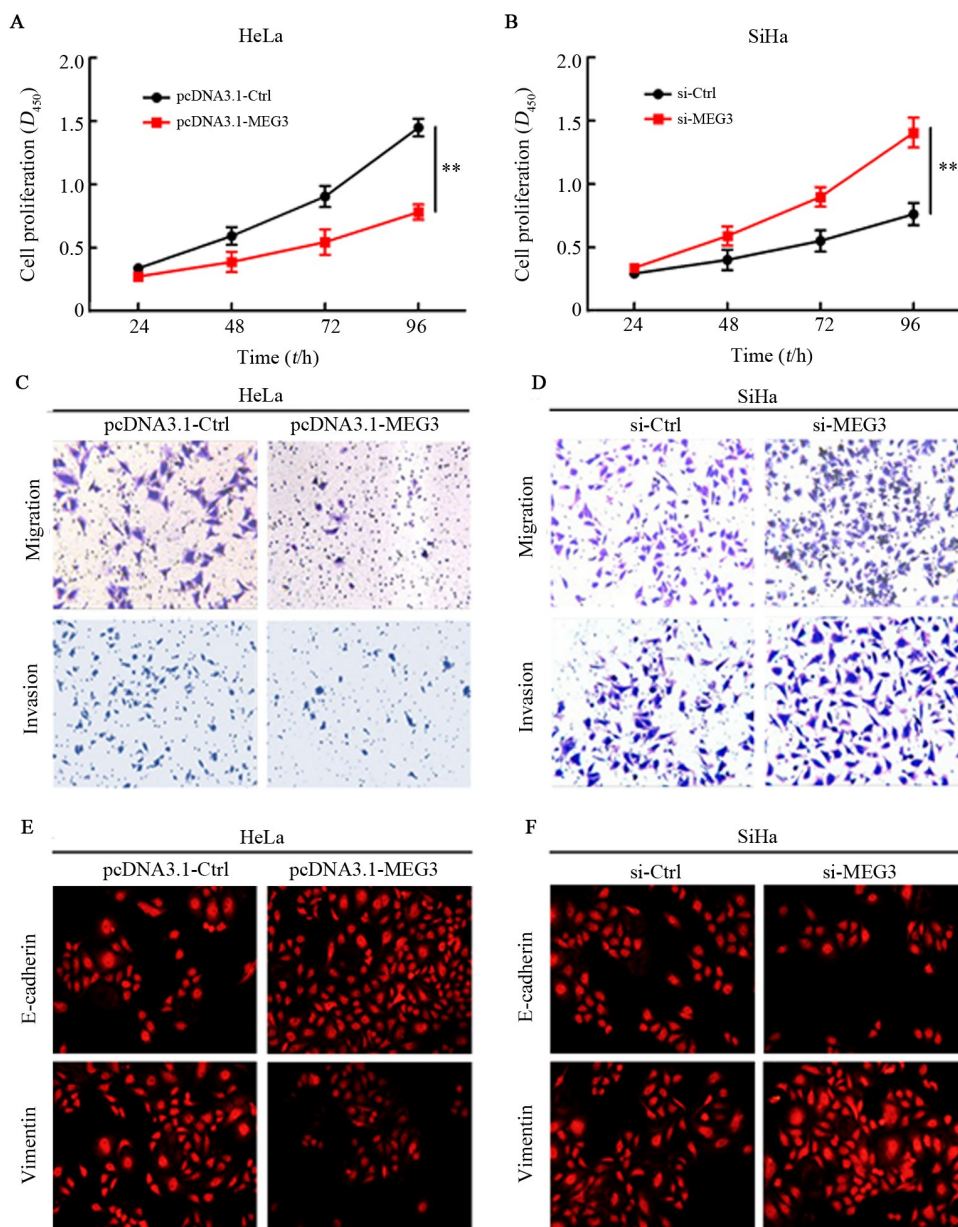
CCK-8 法检测结果显示, 过表达 MEG3 使 HeLa 细胞的增殖能力显著下降 ( $t=16.78$ ,  $P<0.01$ ; 图 2A); 沉默 MEG3 使 SiHa 细胞的增殖能力明显增强 ( $t=17.01$ ,  $P<0.01$ ; 图 2B)。

Transwell 实验结果(图 2C、D)显示, 与 pcDNA3.1-Ctrl 组相比, 过表达 MEG3 使 HeLa 细胞的迁移、侵袭数目显著减少[迁移: ( $24.56 \pm 1.01$ ) vs ( $60.12 \pm 1.23$ ) 个,  $t=21.45$ ,  $P<0.01$ ; 侵袭: ( $20.12 \pm 1.13$ ) vs ( $55.21 \pm 1.04$ ) 个,  $t=20.34$ ,  $P<0.01$ ]; 与 si-Ctrl 组相比, 沉默 MEG3 后 SiHa 细胞的迁移、侵袭数目显著增多[迁移: ( $122.23 \pm 1.62$ ) vs ( $89.21 \pm 1.56$ ) 个,  $t=11.21$ ,  $P<0.01$ ; 侵袭: ( $100.27 \pm 1.32$ ) vs ( $62.78 \pm$

$1.43$ ) 个,  $t=18.94$ , 均  $P<0.01$ ]。

细胞免疫荧光染色实验结果(图 2E、F)表明, 与 pcDNA3.1-Ctrl 组相比, 过表达 MEG3 使 HeLa 细胞中 E-cadherin 阳性表达率明显升高 [ $(78.45 \pm 1.25)\%$  vs ( $34.65 \pm 1.02$ )%,  $\chi^2=14.75$ ,  $P<0.01$ ]、vimentin 阳性表达率明显降低 [ $(22.23 \pm 1.12)\%$  vs ( $58.32 \pm 1.07$ )%,  $\chi^2=20.67$ ,  $P<0.01$ ]; 与 si-Ctrl 组相比, 沉默 MEG3 使 SiHa 细胞 E-cadherin 阳性表达率明显降低 [ $(22.21 \pm 1.02)\%$  vs ( $50.23 \pm 1.13$ )%,  $\chi^2=21.54$ ,  $P<0.01$ ]、vimentin 阳性表达率明显升高 [ $(83.34 \pm 1.21)\%$  vs ( $64.45 \pm 1.15$ )%,  $\chi^2=15.43$ ,  $P<0.01$ ]。

上述实验结果表明, MEG3 抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移、侵袭与 EMT 进程。



\*\* $P<0.01$

图 2 MEG3 对 HeLa 和 SiHa 细胞增殖(A、B)、迁移与侵袭(C、D)与 EMT(E、F)进程的影响

Fig.2 Effects of MEG3 on proliferation (A, B), migration and invasion (C, D) as well as EMT (E, F) of HeLa and SiHa cells

### 2.3 miR-9-5p 是 MEG3 的靶标

qPCR 检测结果表明, miR-9-5p 在宫颈癌组织中表达水平显著高于癌旁组织 ( $t=15.43, P<0.01$ ; 图 3A); miR-9-5p 在 HeLa 和 SiHa 细胞中表达水平显著高于 HcerEpic 细胞 ( $F=28.12, P<0.01$ ; 图 3B)。转染 miR-9-5p inhibitor 和 miR-9-5p mimics 后, 与对照组比较, miR-9-5p 在 HeLa 细胞中低表达、SiHa 细胞中高表达 ( $0.52\pm 0.05$  vs  $1.00\pm 0.05, t=17.32, P<0.01$ ;  $1.61\pm 0.13$  vs  $1.00\pm 0.04, t=15.75, P<0.01$ )。

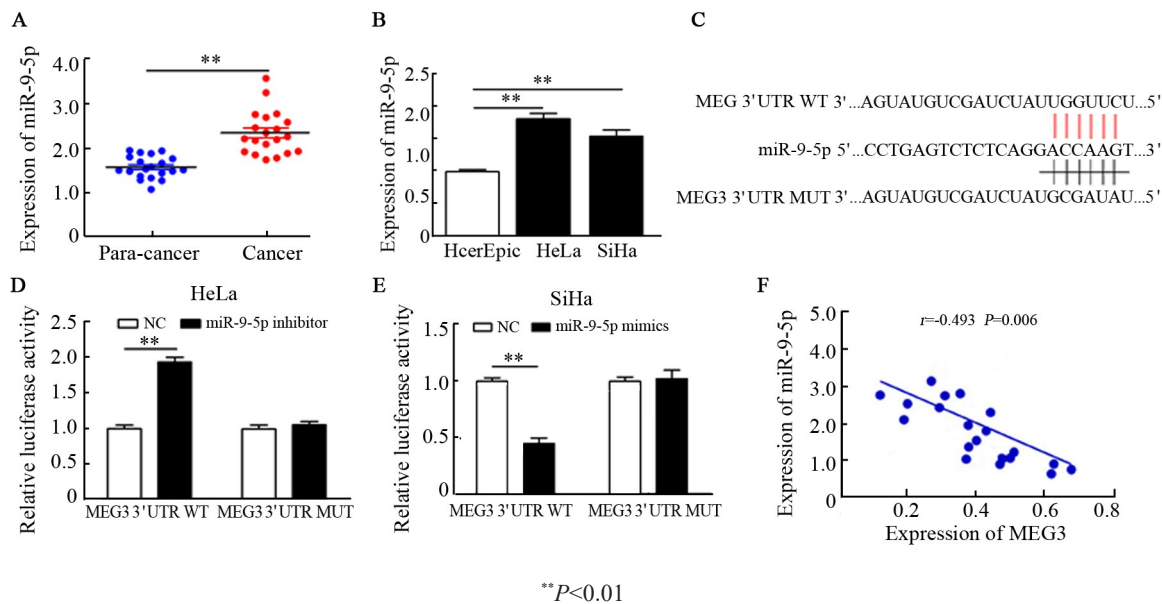
通过 TargetScan 数据库分析发现, miR-9-5p 与 MEG3 存在潜在结合位点(图 3C)。双荧光素酶报告基因测定结果表明, miR-9-5p 明显抑制了携带 MEG3 3'UTR WT 的荧光素酶活性 ( $t=18.43, 19.21, P<0.01$ ; 图 3D、E), 但当报告质粒携带 MEG3 3'UTR MUT 时未观察到明显的抑制作用。Pearson 相关分

析显示, 在宫颈癌组织中 miR-9-5p 与 MEG3 表达之间呈负相关 ( $r=-0.4973, P<0.01$ ; 图 3F)。

与 pcDNA3.1-Ctrl 组, 过表达 MEG3 可降低 HeLa 细胞中 miR-9-5p 的表达水平 ( $0.43\pm 0.11$  vs  $1.00\pm 0.06, t=14.42, P<0.05$ ); 与 si-Ctrl 组相比, 沉默 MEG3 可提高 SiHa 细胞中 miR-9-5p 的表达水平 ( $1.63\pm 0.13$  vs  $1.00\pm 0.13, t=15.22, P<0.01$ )。

与 NC 组相比, 沉默 miR-9-5p 使 HeLa 细胞中 MEG3 表达水平明显升高 ( $1.56\pm 0.43$  vs  $1.00\pm 0.12, t=15.89, P<0.01$ ); 过表达 miR-9-5p 使 SiHa 细胞中 MEG3 表达水平显著下降 ( $0.41\pm 0.06$  vs  $1.00\pm 0.12, t=16.56, P<0.01$ )。

上述实验结果表明, 宫颈癌细胞中 MEG3 可以直接与 miR-9-5p 结合, 且两者具有相互抑制的作用。



A and B: qPCR was used to detect the expression of miR-9-5p in cervical cancer tissues and cells; C: The binding site between miR-9-5p and MEG3; D and E: Dual luciferase reporter gene assay determined the interaction between miR-9-5p and MEG3 in HeLa and SiHa cells; F: Pearson correlation analysis of the association between miR-9-5p and MEG3

图3 miR-9-5p 在宫颈癌组织和细胞中的表达及其与 MEG3 的靶向关系

Fig.3 Expression of miR-9-5p in cervical cancer tissues and cells and its targeting relationship with MEG3

### 2.4 miR-9-5p 促进宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭与 EMT 进程

CCK-8 实验结果表明, 沉默 miR-9-5p 明显降低 HeLa 细胞的增殖能力 ( $t=17.54, P<0.01$ ; 图 4A); 过表达 miR-9-5p 明显增强 SiHa 细胞的增殖能力 ( $t=16.84, P<0.01$ ; 图 4B)。

Transwell 实验结果表明, 与 NC 相比, 沉默 miR-9-5p 使 HeLa 细胞的迁移和侵袭数目明显减少 [迁移: ( $45.14\pm 0.78$ ) vs ( $122.34\pm 2.12$ ) 个,  $t=19.32, P<0.01$ ; 侵袭: ( $22.13\pm 0.86$ ) vs ( $52.10\pm 1.06$ ) 个,  $t=13.31,$

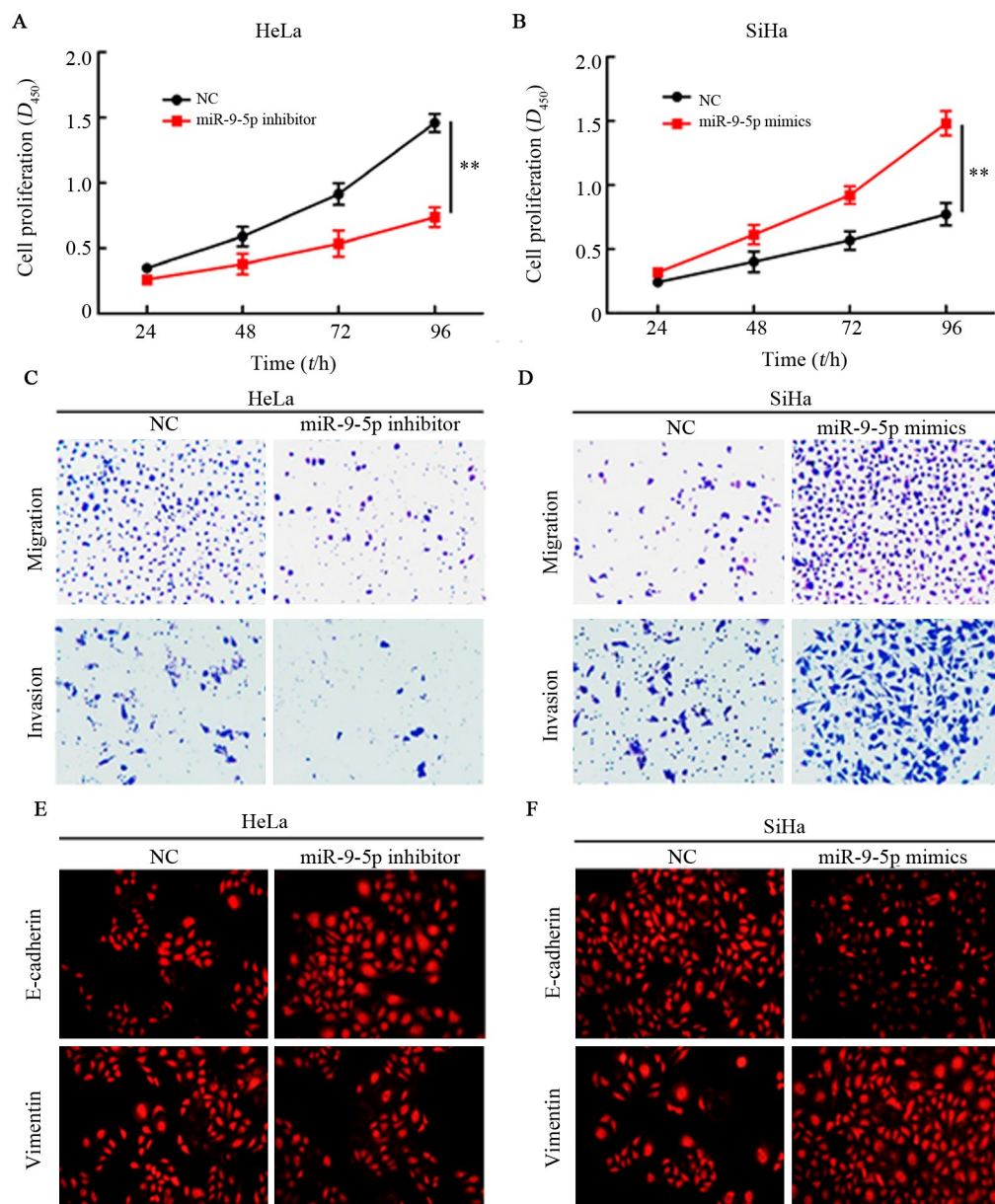
$P<0.01$ ; 图 4C]; 过表达 miR-9-5p 使 SiHa 细胞的迁移和侵袭数目明显增多 [迁移: ( $153.21\pm 1.43$ ) vs ( $59.23\pm 1.12$ ) 个,  $t=19.13, P<0.01$ ; 侵袭: ( $144.32\pm 1.18$ ) vs ( $50.27\pm 1.04$ ) 个,  $t=18.93, P<0.01$ ; 图 4D)。

细胞免疫荧光染色实验结果表明, 与 NC 组相比, 沉默 miR-9-5p 使 HeLa 细胞 E-cadherin 阳性表达率升高 [ $(98.42\pm 1.14)\%$  vs ( $56.43\pm 1.04$ )%,  $\chi^2=11.73, P<0.05$ ], vimentin 阳性表达率明显降低 [ $(43.32\pm 1.01)\%$  vs ( $80.12\pm 1.05$ )%,  $\chi^2=15.56, P<0.01$ ; 图 4E]; 过表达 miR-9-5p 使 SiHa 细胞 E-cadherin 阳性表达

率明显降低[(62.28±1.04)% vs (150.27±1.21)% ,  $\chi^2=18.45$ 、 $P<0.01$ ]、vimentin 阳性表达率明显升高 [(125.78±1.24)% vs (74.32±1.05)% ,  $\chi^2=17.78$ 、 $P<0.01$ ;

图4F]。

以上实验结果表明,miR-9-5p 促进宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭和EMT 进程。



\*\* $P<0.01$

A and B: The proliferation of HeLa and SiHa cells was detected by CCK-8 assay; C and D: Transwell assay was used to detect the migration and invasion ability of HeLa and SiHa cells ( $\times 200$ ); E and F: The expression of E-cadherin and vimentin in HeLa and SiHa cells was detected by immunofluorescence staining ( $\times 400$ )

图4 miR-9-5p对宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭与EMT进程的影响

Fig.4 Effects of miR-9-5p on the proliferation, migration, invasion and EMT of cervical cancer cells

### 2.5 SOCS5 与 miR-9-5p、MEG3 之间的相互关系

qPCR 检测结果(图 5A)显示,SOCS5 在宫颈癌组织表达水平显著低于癌旁组织( $t=17.43$ 、 $P<0.01$ ); SOCS5 在 HeLa 和 SiHa 细胞中表达水平显著低于 HcerEpic 细胞( $0.43\pm 0.11$ 、 $0.50\pm 0.07$  vs  $1.00\pm 0.12$  ,  $t=15.43$ 、 $14.21$ ; 均  $P<0.01$ )。

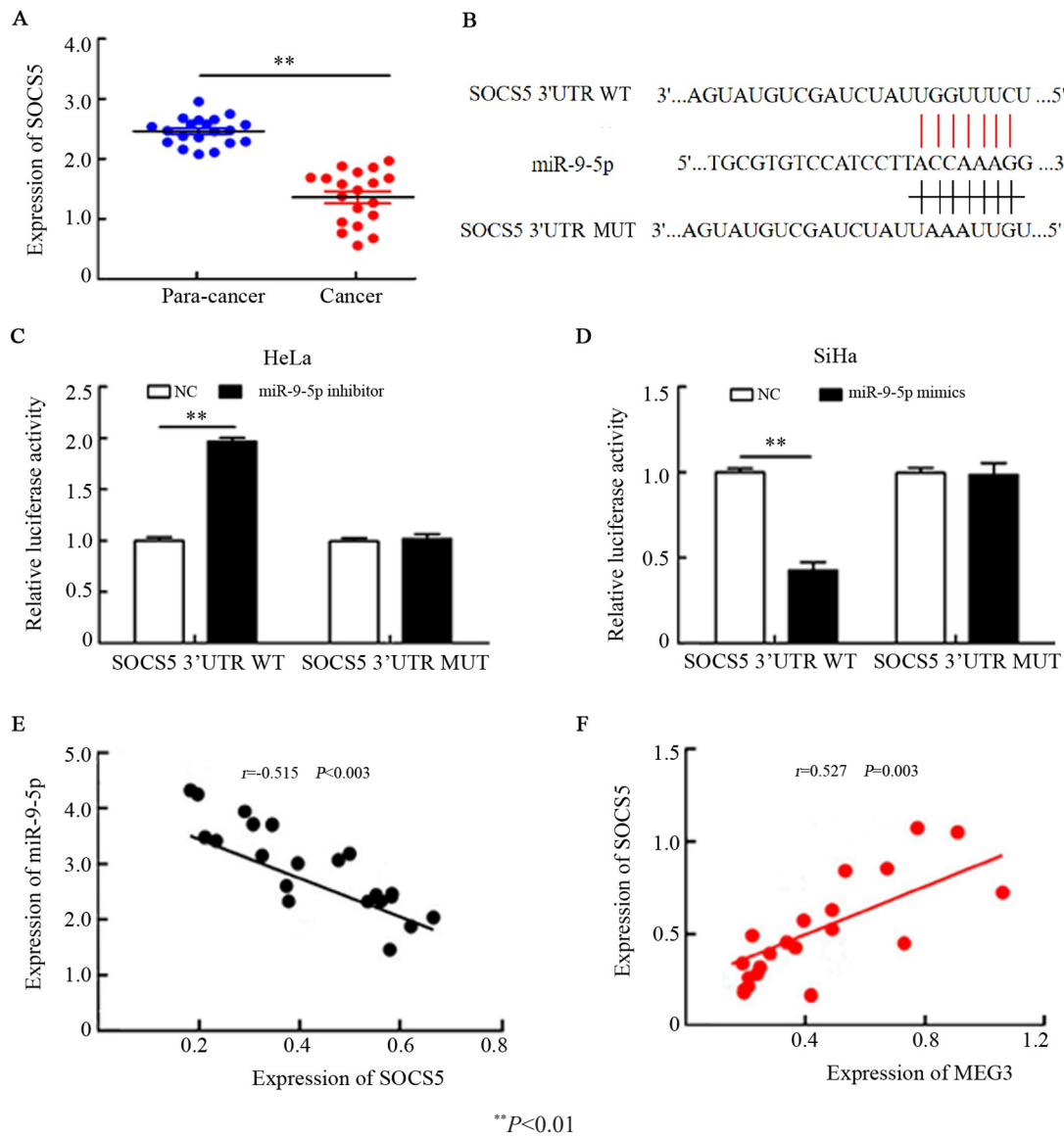
通过 TargetScan 数据库数据分析发现,SOCS5 与 miR-9-5p 存在潜在结合位点(图 5B)。双荧光素酶报告基因实验结果(图 5C、D)显示,miR-9-5p 明显抑制携带 SOCS5 3'UTR WT 的荧光素酶活性( $t=17.12$ 、 $16.34$ , 均  $P<0.01$ ),而对质粒携带 SOCS5 3'UTR MUT 时未观察到明显的抑制作用( $P>0.05$ )。

qPCR 检测结果显示,与NC组相比,沉默 miR-9-5p 使 HeLa 细胞中 SOCS5 的表达水平上调( $1.67 \pm 0.18$  vs  $1.00 \pm 0.06$ ,  $t=18.92$ ,  $P<0.01$ );过表达 miR-9-5p 使 SiHa 细胞中 SOCS5 的表达水平下调( $0.41 \pm 0.18$  vs  $1.00 \pm 0.08$ ,  $t=17.45$ ,  $P<0.01$ )。Pearson 相关分析结果(图 5E)显示,宫颈癌组织中 SOCS5 与 miR-9-5p 表达之间呈负相关( $r=-0.5152$ ,  $P<0.01$ )。

与 pcDNA3.1-Ctrl 组相比,过表达 MEG3 使 HeLa

细胞中 SOCS5 的表达水平上调( $1.71 \pm 0.78$  vs  $1.00 \pm 0.06$ ,  $t=16.54$ ,  $P<0.01$ );与 si-Ctrl 组相比,沉默 MEG3 后 SiHa 细胞中 SOCS5 的表达水平显著下调( $0.47 \pm 0.12$  vs  $1.00 \pm 0.11$ ,  $t=15.43$ ,  $P<0.01$ )。Pearson 相关分析显示,在宫颈癌组织中观察到 SOCS5 与 MEG3 表达之间呈正相关( $r=0.5273$ ,  $P<0.01$ ;图 5F)。

以上实验结果表明,SOCS5 是 miR-9-5p 的直接靶标,受 miR-9-5p 的负调控和 MEG3 的正调控。



A: qPCR was used to detect the expression of SOCS5 in cervical cancer tissues; B: The binding site between miR-9-5p and SOCS5; C and D: Dual luciferase reporter gene assay was used to detect the interaction between miR-9-5p and SOCS5 in HeLa and SiHa cells; E and F: Pearson correlation analysis showed the relationship between miR-9-5p and SOCS5

图5 SOCS5在宫颈癌组织和细胞中的表达及其与miR-9-5p和MEG3的关系

Fig.5 SOCS5 expression in cervical cancer tissues and cells and its relationship with miR-9-5p and MEG3

## 2.6 MEG3/miR-9-5p/SOCS5 轴影响宫颈癌细胞增殖、侵袭、迁移和EMT进程

qPCR 检测结果表明,与 pcDNA3.1-MEG3+NC 组相比,过表达 miR-9-5p 后 HeLa 细胞中 SOCS5 的

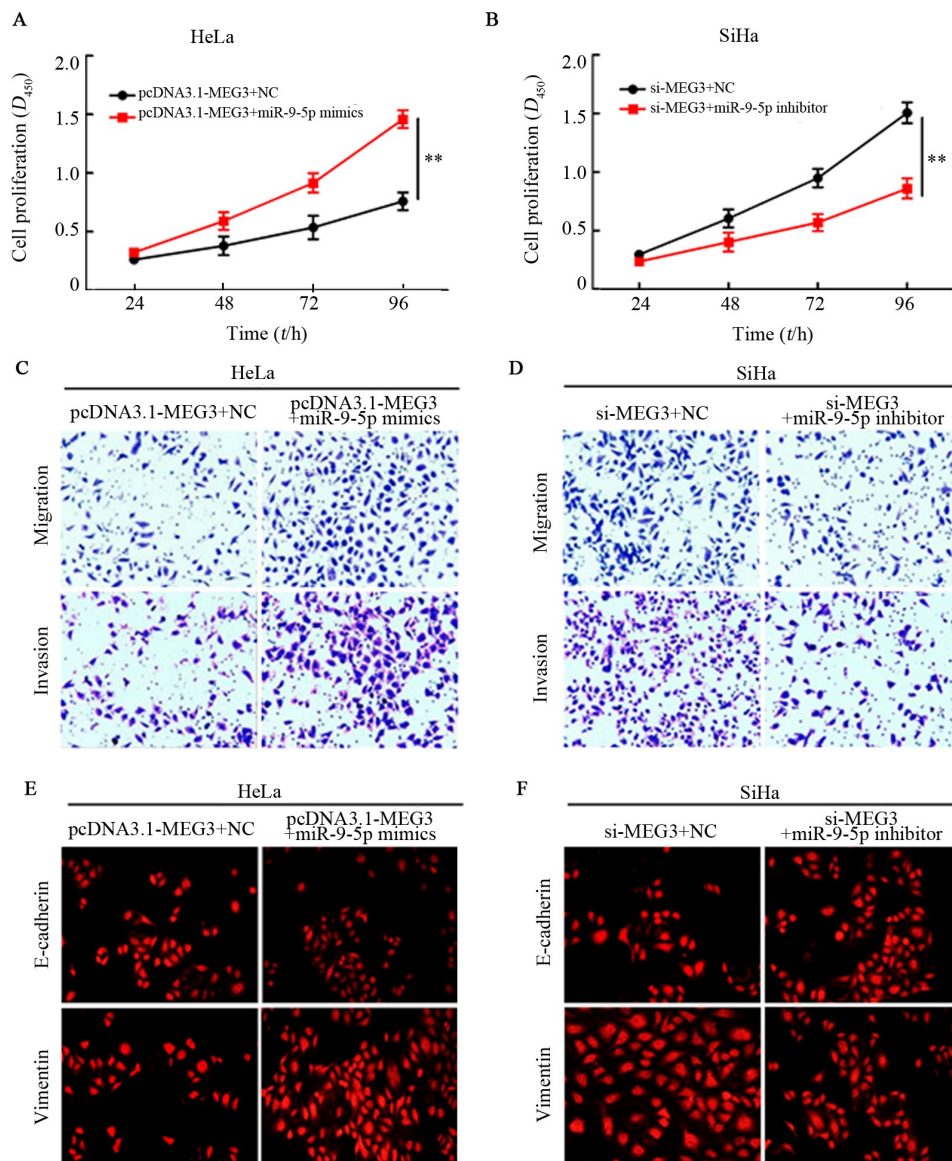
表达水平明显下降( $0.45 \pm 0.08$  vs  $1.00 \pm 0.05$ ,  $t=18.17$ ,  $P<0.01$ );与 si-MEG3+NC 组相比,沉默 miR-9-5p 使 SiHa 细胞中 SOCS5 的表达水平明显升高( $1.61 \pm 0.18$  vs  $1.00 \pm 0.05$ ,  $t=17.14$ ,  $P<0.01$ )。

CCK-8 实验结果显示, 与 pcDNA3.1-MEG3+NC 组相比, 过表达 miR-9-5p 使 HeLa 细胞的增殖能力显著增强 ( $t=15.78, P<0.01$ ; 图 6A); 与 si-MEG3+NC 组比较, 沉默 miR-9-5p 使 HeLa 细胞的增殖能力显著减弱 ( $t=14.34, P<0.01$ ; 图 6B)。

Transwell 实验结果显示, 与 pcDNA3.1-MEG3+NC 组相比, 过表达 miR-9-5p 使 HeLa 细胞的迁移、侵袭细胞数目显著增多[迁移: (127.89±2.15) vs (61.78±1.06) 个,  $t=24.32, P<0.01$ ; 侵袭: (118.43±2.01) vs (48.32±1.04) 个,  $t=22.17, P<0.01$ ; 图 6C]; 与 si-MEG3+NC 组相比, 沉默 miR-9-5p 使 SiHa 细胞的迁移、侵袭细胞数目显著减少[迁移: (52.67±1.45) vs (143.56±2.23) 个,  $t=23.10,$

$P<0.01$ ; 侵袭: (45.21±1.03) 个 vs (134.43±1.78) 个,  $t=22.98, P<0.01$ ; 图 6D]。

细胞免疫荧光染色结果显示, 与 pcDNA3.1-MEG3+NC 组相比, 过表达 miR-9-5p 使 HeLa 细胞 E-cadherin 阳性表达率显著下降 [(23.67±0.78)% vs (50.12±1.05)%],  $\chi^2=12.67, P<0.05$ 、vimentin 阳性表达率显著升高 [(98.23±1.14)% vs (46.14±1.01)%],  $\chi^2=19.65, P<0.01$ ; 图 6E]; 与 si-MEG3+NC 组相比, 沉默 miR-9-5p 使 SiHa 细胞 E-cadherin 阳性表达率显著升高 [(57.89±1.03)% vs (25.18±0.94)%],  $\chi^2=14.67, P<0.05$ , 而 vimentin 阳性表达率显著下降 [(75.01±1.11)% vs (96.23±1.28)%],  $\chi^2=14.03, P<0.05$ ; 图 6F]。



\*\* $P<0.01$

A and B: CCK-8 assay was used to detect the proliferation of HeLa and SiHa cells; C and D: Transwell assay was used to detect the migration and invasion ability of HeLa and SiHa cells ( $\times 200$ ); E and F: Immunofluorescence staining was used to analyze the expression of E-cadherin and vimentin in HeLa cells and SiHa cells ( $\times 400$ )

图 6 MEG3/miR-9-5p/SOCS5 轴调控宫颈癌细胞的增殖、迁移、侵袭与 EMT 进程

Fig.6 MEG3/miR-9-5p/SOCS5 axis regulated the proliferation, migration, invasion and EMT process of cervical cancer cells



以上实验结果表明,MEG3/miR-9-5p/SOCS5 轴调控宫颈癌细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程。

### 3 讨论

宫颈癌是世界上女性发病率仅次于乳腺癌的第 2 大恶性肿瘤,其病死率极高<sup>[11-12]</sup>。目前,手术、化疗和放疗对宫颈癌的疗效并不令人满意,特别是在晚期宫颈癌患者。许多国家已经建立了宫颈癌筛查方法,可有效降低宫颈癌的发病率和病死率。这些筛查程序依靠宫颈涂片细胞学检查<sup>[12]</sup>,但是该方法具有较高的假阳性和假阴性,因此寻找客观、准确的宫颈癌检测生物标志物至关重要。

lncRNA 是一类 RNA 转录物,长度大于 200 个核苷酸<sup>[13]</sup>,其可以调控蛋白质编码基因、转录,并在生物学过程中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。lncRNA MEG3 可调控基因表达,在骨肉瘤<sup>[15]</sup>、成视网膜细胞瘤<sup>[16]</sup>和甲状腺癌中具有抑癌作用<sup>[17]</sup>。研究<sup>[6]</sup>表明,MEG3 在宫颈癌组织中低表达,其表达与患者预后密切相关,且 MEG3 表达上调抑制宫颈癌细胞增殖并促进细胞凋亡。本实验发现,MEG3 在宫颈癌组织和细胞系中低表达,与上述文献报道一致;过表达 MEG3 可抑制宫颈癌细胞增殖、侵袭、迁移和 EMT 进程。因此 MEG3 有可能作为一类新型潜在的生物标志物或肿瘤治疗靶标。

miRNA 调控靶基因的表达、介导细胞的生物学过程,如细胞分化、增殖和凋亡<sup>[18]</sup>。研究表明 miR-9-5p 与几种肿瘤的进展有关。LI 等<sup>[19]</sup>发现,miR-9-5p 通过抑制重组人转化生长因子 B 受体-2(TGFB2)的表达促进非小细胞肺癌细胞的增殖和转移;WANG 等<sup>[20]</sup>指出,miR-9-5p 通过靶向谷草转氨酶基因(GOT1)抑制胰腺癌细胞的增殖、侵袭和谷氨酰胺代谢。本研究表明,miR-9-5p 在宫颈癌组织和细胞系中高表达;过表达 miR-9-5p 可能促进宫颈癌细胞的增殖、侵袭、迁移与 EMT 进程;利用 TargetScan 数据库预测 MEG3 与 miR-9-5p 的结合位点,双荧光素酶报告基因实验进一步证实 MEG3 与 miR-9-5p 的靶向关系,且 MEG3 与 miR-9-5p 的表达呈负相关。

SOCS5 是一种 SOCS 蛋白家族成员,SOCS 蛋白家族被称为 STAT-诱导的 STAT 抑制剂(STAT-induced STAT inhibitor, SSI),包含 SOCS1~7 和 CIS 等 8 个成员。研究<sup>[10]</sup>发现,SOCS5 在甲状腺癌和肝癌中低表达。本研究发现,SOCS5 在宫颈癌组织和细胞系中低表达,过表达 SOCS5 可抑制宫颈癌细胞的增殖、侵袭、迁移和 EMT 进程;使用 TargetScan 数据库预测 miR-9-5p 与 SOCS5 的结合位点,双荧光素酶报告基因检测进一步证实了 miR-9-5p 与 SOCS5 的靶向关系,且 miR-9-5p 与 SOCS5 的表达呈负相关。

本研究发现,miR-9-5p 可能靶向 MEG3 和 SOCS5,并且通过靶向关系进行负调控,进一步影响宫颈癌细胞的增殖、侵袭、迁移和 EMT 进程。因此,MEG3/miR-9-5p/SOCS5 轴可能抑制宫颈癌细胞的增殖、侵袭、迁移和 EMT 进程,有望成为宫颈癌有价值的治疗靶点。

综上所述,本研究结果表明宫颈癌中 MEG3、miR-9-5p 与 SOCS5 分子之间的存在相互作用关系,MEG3 通过 miR-9-5p/SOCS5 轴抑制宫颈癌的发生发展。因此,MEG3/miR-9-5p/SOCS5 轴可以用作缓解宫颈癌进展的治疗靶标。

### [参考文献]

- [1] SIVA S, DEBS Y, YOUNG R J, et al. <sup>18</sup>F-FDG PET/CT following chemoradiation of uterine cervix cancer provides powerful prognostic stratification independent of HPV status: a prospective cohort of 105 women with mature survival data[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2015, 42(12): 1825-1832. DOI: 10.1007/s00259-015-3112-8.
- [2] SEO Y, KIM M S, YOO H J, et al. Salvage stereotactic body radiotherapy for locally recurrent uterine cervix cancer at the pelvic sidewall: feasibility and complication[J/OL]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2016, 12(2): e280-e288[2020-02-04]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ajco.12185>. DOI:10.1111/ajco.12185.
- [3] CUI X R, YI Q, JING X, et al. Mining prognostic significance of MEG3 in human breast cancer using bioinformatics analysis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(1): 41-51. DOI:10.1159/000493956.
- [4] DAI Y X, WAN Y K, QIU M K, et al. LncRNA MEG3 suppresses the tumorigenesis of hemangioma by sponging miR-494 and regulating PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(6): 2872-2886. DOI:10.1159/000496040.
- [5] JIN L Y, CAI Q, WANG S H, et al. Long noncoding RNA MEG3 regulates LATS2 by promoting the ubiquitination of EZH2 and inhibits proliferation and invasion in gallbladder cancer[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 1017[2020-02-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6170488/>. DOI:10.1038/s41419-018-1064-1.
- [6] ZHANG J, GAO Y L. Long non-coding RNA MEG3 inhibits cervical cancer cell growth by promoting degradation of P-STAT3 protein via ubiquitination[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 175[2020-02-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6615085/>. DOI:10.1186/s12935-019-0893-z.
- [7] SHUKLA G C, SINGH J, BARIK S. MicroRNAs: processing, maturation, target recognition and regulatory functions[J/OL]. *Mol Cell Pharmacol*, 2011, 3(3): 83-92[2020-02-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3315687/>.
- [8] LI W F, LIANG J J, ZHANG Z C, et al. MicroRNA-329-3p targets MAPK1 to suppress cell proliferation, migration and invasion in cervical cancer[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(5): 2743-2750. DOI: 10.3892/or.2017.5555.
- [9] VOJTECHOVA Z, SABOL I, SALAKOVA M, et al. Comparison of the miRNA profiles in HPV-positive and HPV-negative tonsillar tumors and a model system of human keratinocyte clones[J/OL]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 382[2020-02-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

- PMC4932682/. DOI:10.1186/s12885-016-2430-y.
- [10] ZHUANG G L, WU X M, JIANG Z S, et al. Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway[J/OL]. *EMBO J*, 2012, 31(17): 3513-3523 [2020-02-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3433782/>. DOI:10.1038/emboj.2012.183.
- [11] YU J W, ZHANG J L, ZHOU L L, et al. The octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) pseudogene, POU domain class 5 transcription factor 1B (POU5F1B), is upregulated in cervical cancer and down-regulation inhibits cell proliferation and migration and induces apoptosis in cervical cancer cell lines[J/OL]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1204-1213[2020-02-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6383437/>. DOI:10.12659/MSM.912109.
- [12] 姬欢欢, 董晓雷, 朱晓峰, 等. C-藻蓝蛋白抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的宫颈癌 Caski 细胞上皮-间充质转化[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(2): 129-134. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.02.005. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.
- [13] DIVER E, HINCHCLIFF E, GOCKLEY A, et al. Minimally invasive radical hysterectomy for cervical cancer is associated with reduced morbidity and similar survival outcomes compared with laparotomy[J]. *J Minim Invasive Gynecol*, 2017, 24(3): 402-406. DOI: 10.1016/j.jmig.2016.12.005.
- [14] NOVIKOVA I V, HENNELLY S P, SANBONMATSU K Y. Tackling structures of long noncoding RNAs[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(12): 23672-23684[2020-02-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3876070/>. DOI:10.3390/ijms141223672.
- [15] EADES G. Long non-coding RNAs in stem cells and cancer[J]. *World J Clin Oncol*, 2014, 5(2): 134. DOI:10.5306/wjco.v5.i2.134.
- [16] SHI Y, LV C, SHI L, et al. MEG3 inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of human osteosarcoma cells[J/OL]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2): 1917-1923[2020-02-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5776952/>. DOI:10.3892/ol.2017.7463.
- [17] GAO Y L, HUANG P, ZHANG J. Hypermethylation of MEG3 promoter correlates with inactivation of MEG3 and poor prognosis in patients with retinoblastoma[J/OL]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 268 [2020-02-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5747938/>. DOI:10.1186/s12967-017-1372-8.
- [18] WANG C, YAN G, ZHANG Y, et al. Long non-coding RNA MEG3 suppresses migration and invasion of thyroid carcinoma by targeting of Rac1[J]. *Neoplasma*, 2015, 62(4): 541-549. DOI: 10.4149/neo\_2015\_065.
- [19] LI G, WU F, YANG H, et al. MiR-9-5p promotes cell growth and metastasis in non-small cell lung cancer through the repression of TGFBR2[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2017, 96: 1170-1178. DOI:10.1016/j.biopha.2017.11.105.
- [20] WANG Y N, XUE J F, KUANG H Y, et al. MicroRNA-1297 inhibits the growth and metastasis of colorectal cancer by suppressing cyclin D2 expression[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(11): 991-999. DOI: 10.1089/dna.2017.3829.
- [21] WANG J, WANG B, REN H Q, et al. MiR-9-5p inhibits pancreatic cancer cell proliferation, invasion and glutamine metabolism by targeting GOT1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(1): 241-248. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.12.114.

[收稿日期] 2020-02-05

[修回日期] 2020-05-19

[本文编辑] 党瑞山