

MiR-4262 经 Kaiso- β -catenin 途径抑制宫颈癌 Hela 细胞的增殖

高芳圆,李彦英,冯 静,张 亮,苏梦亚,颜瑞雪,姚海荣,齐冰丽

(沧州市中心医院妇一科,河北 沧州 061000)

摘要: 分析 miR-4262 抑制宫颈癌细胞增殖的 Kaiso- β -catenin 机制。将 miR-4262 表达载体 pGL3-miR-4262 表达载体瞬时转染 Hela 宫颈癌细胞株作为 miR-4262 组,以未转染 Hela 细胞和转染 pGL3 空载体细胞分别作为空白组和阴性组,分析各组细胞的增殖情况,免疫印迹法分析各组细胞中细胞凋亡蛋白、Kaiso、 β -catenin 及 Axin 蛋白的表达。结果显示:与空白组和阴性组相比,miR-4262 组细胞的抑制率明显升高 ($P < 0.05$),Bax 和 Caspase3 表达明显升高而 Bcl2 表达明显降低 ($P < 0.05$),且 Kaiso、 β -catenin 表达明显升高而 Axin 表达明显降低 ($P < 0.05$)。因此,miR-4262 能明显抑制宫颈癌细胞的增殖,且其作用可能与调节 Kaiso- β -catenin 信号通路蛋白表达有关。

关键词: 微小 RNA; 宫颈癌; 增殖; 细胞凋亡; Kaiso- β -catenin 信号通路

中图分类号:R737.33

文献标识码:A

Mi-4262 inhibiting proliferation of cervical cancer cells through kaiso-beta-catenin

GAO Fangyuan, LI Yanying, FENG Jing, ZHANG Liang, SU Mengya,

YAN Ruixue, YAO Hairong, QI Bingli

(Department of Gynaecology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, Hebei, China)

Abstract: The aim of this study was to analyze the Kaiso-beta-catenin mechanism of microRNA-4262 inhibiting the proliferation of cervical cancer cells. The expression vector pGL3-miR-4262 was transfected into Hela cervical cancer cell line as the group of microRNA-4262. Non-transfected Hela cells and pGL3 empty vector cells were used as blank group and negative group, respectively. The proliferation of cells in each group was analyzed. The expression of apoptotic protein, Kaiso, beta-catenin and Axin protein were analyzed by Western blot. The results showed that compared with the blank group and the negative group, the inhibition rate of the cells in the microRNA-4262 group increased significantly ($P < 0.05$), the expression of Bax and Caspase-3 increased significantly, and the expression of Bcl-2 decreased significantly ($P < 0.05$). The expression of Kaiso and beta-catenin increased significantly, while the expression of Axin decreased significantly ($P < 0.05$). So Mi-4262 can significantly inhibit the proliferation of cervical cancer cells, and its effect may be related to the regulation of Kaiso-beta-catenin signaling pathway protein expression.

Key words: MicroRNA; cervical cancer; proliferation; apoptosis; Kaiso-beta-catenin signaling pathway

宫颈癌是临床上最常见的妇科恶性肿瘤之一,其发病率有年轻化的趋势^[1-2]。虽然通过早期筛查和治疗,宫颈癌的发病率有逐年降低的趋势,但其仍然是临床导致死亡的主要肿瘤^[3]。微小 RNA (microRNAs, miRNA) 是一类由 18 ~ 24 个单核苷酸所组成的非编码的 RNA,对基因的表达起着关键的调控作用,而 miR-4262 是最常见的 miRNA 之一,其水平与多种恶性肿瘤的发病及治疗密切相

关。miR-4262 在多种肿瘤中被鉴定为肿瘤启动子,而低水平的 miR-4262 预示着肿瘤患者预后较差,miR-4262 可以靶向原癌基因 cd163 抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭^[4-5]。Kaiso 是 BTB/POZ 蛋白家族的成员,可以通过形成抑制复合物对目标基因表达等环节进行抑制,且对 Wnt 信号通路有正性调节作用^[6]。 β -catenin 是 Wnt 信号通路的关键分子,与肿瘤细胞的增殖、分化、转移和凋亡等过程密切相关^[7]。本研究分析 miR-4262 抑制宫颈癌细胞增殖的 Kaiso- β -catenin 机制,为临床治疗及药物研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞及分组

宫颈癌 Hela 细胞株购自中科院上海细胞所;培养基及牛血清均购自 Hyclone 公司;pGL3-miR-4262 表达载体由本实验室构建并保存。Bax/Bcl2 及 Caspase3 一抗购自 Santa Cruz 公司;Kaiso 一抗购自 R&D 公司; β -catenin 及 Axin 一抗购自 CST 公司。将 miR-4262 表达载体 pGL3-miR-4262 表达载体瞬时转染 Hela 宫颈癌细胞株作为 miR-4262 组,以未转染 Hela 细胞和转染 pGL3 空载体细胞分别作为空白组和阴性组。分析各组细胞处理 24 h 及 48 h 后细胞增殖的抑制情况,分析细胞处理 48 h 后相关蛋白的表达情况。

1.2 MTT 法

miR-4262pGL3 载体构建过程:扩增引物为正向 5'-TGC GGGACATTCAGA-3', 反向 5'-GGAGTG-CAGGGTCCGAGGT-3',步骤为扩增 miR-4262 序列-连接 pMD 18-T 转化后筛选阳性克隆-PCR 扩增特异性片段并测序确认-PCR 扩增酶切连接 pGL3 载体。转化筛选阳性克隆测序确认。将 miR-4262 表达载体 pGL3-miR-4262 表达载体瞬时转染 Hela 宫颈癌细胞株作为 miR-4262 组,前期预实验已表明 4 μ g 左右的质粒量具有明显的效果,正式试验转染的质粒的量为 4 μ g。以未转染 Hela 细胞和转染 pGL3 空载体细胞分别作为空白组和阴性组。分别于处理后的第 24 h 及 48 h 轻轻弃去各组细胞培养孔内的培养液,加入 200 μ L 的 MTT 继续于 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养箱条件下培养。无菌磷酸盐缓冲液冲洗后在各组细胞中加入二甲亚砜,震荡处理。用酶标仪检测培养后细胞培养板各个培养孔的吸光度值,并计算抑制率。细胞的增殖抑制率=(对照组 OD 值-试验组 OD 值)/对照组 OD 值 $\times$ 100%。

1.3 Western Blotting 法

各组细胞处理后提取细胞的总蛋白并进行定量。以等量总蛋白上样后进行十二烷基苯磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),溴酚蓝电泳至凝胶底部时停止电泳。电泳结束后小心取下凝胶并进行半干法 PVDF 转膜(300 mA,45 min)。转膜后用无菌磷酸盐缓冲液冲洗。5% 的胎牛血清进行膜封闭 10 min。室温条件下将 PVDF 膜与第一抗体(400 $\times$)孵育 60 min,无菌 PBS 冲洗(5 min $\times$ 3 次)后,与二抗(800 $\times$)孵育 60 min。PBS 冲洗 3 次后显色,拍照。以 β -actin 为内参进行蛋白表达的相对定

量分析。

1.4 统计分析

数据统计采用 SPSS 21.0 统计软件完成,计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析,总体比较有差异再采用 LST-*t* 检验进行两两比较,计数资料采用百分比表示,组间比较采用卡方检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-4262 抑制宫颈癌细胞增殖效果分析

与空白组和阴性组相比,miR-4262 组细胞的抑制率明显升高($P<0.05$),见图 1。

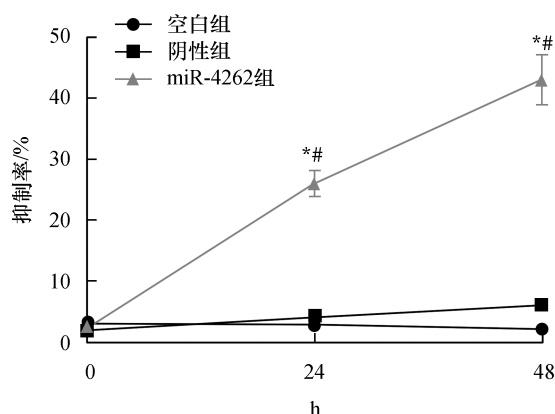


图 1 miR-4262 抑制宫颈癌细胞增殖效果分析

与对照组比较,* $P<0.05$;与阴性组比较,# $P<0.05$

2.2 各组细胞中细胞凋亡蛋白的表达

与空白组和阴性组比较,miR-4262 组细胞的 Bax 和 Caspase3 表达明显升高而 Bcl2 表达明显降低($P<0.05$),见图 2、表 1。

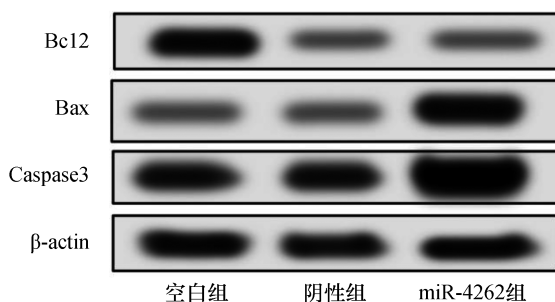


图 2 各组细胞中细胞凋亡蛋白的表达分析

2.3 各组细胞中 Kaiso、 β -catenin 及 Axin 蛋白的表达

与空白组和阴性组比较,miR-4262 组细胞的

Kaiso、 β -catenin 表达明显升高而 Axin 表达明显降低($P<0.05$),见图 3、表 2。

表 1 各组细胞中细胞凋亡蛋白的表达分析

组别	Bax/ β -actin	Bcl2/ β -actin	Caspase3/ β -actin
空白组	0.20 $\pm$ 0.05	0.43 $\pm$ 0.11	0.23 $\pm$ 0.09
阴性组	0.22 $\pm$ 0.07	0.42 $\pm$ 0.09 ^a	0.24 $\pm$ 0.08 ^a
miR-4262 组	0.41 $\pm$ 0.11	0.34 $\pm$ 0.07 ^{ab}	0.49 $\pm$ 0.13 ^{ab}
<i>F</i>	36.768	43.777	43.435
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

与对照组比较,^a $P<0.05$;与阴性组比较,^b $P<0.05$

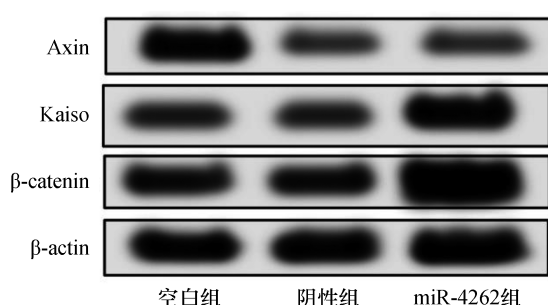


图 3 各组细胞中 Kaiso、 β -catenin 及 Axin 蛋白的表达分析

表 2 各组细胞中 Kaiso、 β -catenin 及 Axin 蛋白的表达分析

组别	Kaiso/ β -actin	β -catenin/ β -actin	Axin/ β -actin
空白组	0.16 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.09	0.43 $\pm$ 0.11
阴性组	0.16 $\pm$ 0.04	0.29 $\pm$ 0.07	0.44 $\pm$ 0.14
miR-4262 组	0.33 $\pm$ 0.10 ^{ab}	0.39 $\pm$ 0.08 ^{ab}	0.30 $\pm$ 0.10 ^{ab}
<i>F</i>	37.676	26.445	32.435
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

与对照组比较,^a $P<0.05$;与阴性组比较,^b $P<0.05$

3 讨 论

宫颈癌是妇科临床最常见的恶性肿瘤,也是导致死亡的最常见恶性肿瘤之一。微小 RNA 在多种恶性肿瘤的发生、发展及恶化过程密切相关,且与药物的治疗效果密切联系。miR-4262 为肿瘤发生的启动子,且证据显示胃癌患者的胃组织中的 miR-4262 明显下调,在晚期胃癌中,miR-4262 的水平显著降低。较低水平的 miR-4262 可预测胃癌患者预后较差,而 miR-4262 可靶向原癌基因 CD163,抑制胃癌细胞增殖和侵袭^[8]。microRNAs (miRNAs) 水平和功能的改变与致癌有关。在分析 miR-4262 在人类皮肤恶性黑色素瘤 (CMM) 细胞增殖中的作用和潜在机制中发现 KLF6 在 CMM 细胞中起着肿瘤增强因

子的作用,而 miR-4262 通过 KLF6 介导的 EGFR 失活和 p21 上调促进 CMM 细胞的增殖^[9]。在研究 miR-4262 对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响及其机制时也证实异常表达的 miR-4262 可能通过 galnt4 影响人结肠癌细胞的凋亡和增殖,这似乎是一个有希望的结肠癌治疗靶点^[10]。本研究在分析 miR-4262 抑制宫颈癌细胞增殖的 Kaiso- β -catenin 机制时发现 miR-4262 组细胞的抑制率明显升高,Bax 和 Caspase3 表达明显升高而 Bcl2 表达明显降低,且 Kaiso、 β -catenin 表达明显升高而 Axin 表达明显降低,miR-4262 能明显抑制宫颈癌细胞的增殖,且其作用可能与调节 Kaiso- β -catenin 信号通路蛋白表达有关。

Kaiso 蛋白为 Wnt 信号转导通路的调节蛋白,其水平的异常与恶性肿瘤细胞的增殖、分化、转移及凋亡过程密切相关。Kaiso 和 p120ctn 在胃癌中的表达呈负相关,二者可能共同参与胃癌的发生及分化,且 Kaiso 通过调控连环蛋白 P120ctn 及参与 Wnt 信号通路的激活调控相关基因的表达,进而影响肿瘤增殖、侵袭和转移^[11]。异常的经典的 Wnt 信号通路的激活可以促进肿瘤的发生,P120 连环蛋白/转录抑制因子 Kaiso 对 Wnt 信号通路的靶基因具有调控作用,影响 Wnt 信号通路从而影响肿瘤发生的过程^[12]。本研究也发现 miR-4262 组细胞的抑制率明显升高,Kaiso 表达明显升高且细胞凋亡明显,miR-4262 能明显抑制宫颈癌细胞的增殖可能与调节 Kaiso 蛋白表达有关。Wnt/ β -catenin 信号通路也是药物干预治疗恶性肿瘤的重要靶点^[13-14]。RACK1 和 β -catenin 蛋白异常表达可能与子宫颈癌的发生、发展和预后有关,并影响子宫颈癌的淋巴结转移^[15],抑制宫颈癌细胞 STIM1 基因表达可通过下调 Wnt/ β -catenin 信号通路降低癌细胞的增殖及侵袭能力^[16]。 β -Catenin 在 ESCC 不同分化组间的表达存在水平差异,可为 ESCC 的预后评估提供参考^[17],TRPM3 可能通过激活 Wnt/ β -catenin 通路促进卵巢癌细胞的上皮间质转化过程,进而增强其侵袭转移的能力^[18]。

因此,miR-4262 能明显抑制宫颈癌细胞的增殖,且其作用可能与调节 Kaiso- β -catenin 信号通路蛋白表达有关。但本文仅观察了 24 h 及 48 h 肿瘤细胞的增殖情况,且发现 48 h 时各组细胞的抑制率差异显著,故未再延长观察时间,今后的研究有待进一步延长观察时间进行实验。同时,在以后的研究中将对体内不同临床分期及类型的宫颈癌样本进行病理学和免疫组织化学分析,分析 Kaiso- β -

catenin 信号转导通路在细胞内的定位及表达,为临床更合理的诊断及治疗提供参考。

参考文献:

- [1] 晋熙梦,郭燕,张俊俊,等. 沉默长链非编码 RNA SPRY4-IT1 对宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响[J]. 中国妇幼保健, 2018,33(19):4517-9.
- [2] 薛萍萍,赵燕,邹淑花,等. miR-4279 通过靶向 Gli1 调控宫颈癌的发生发展[J]. 中国妇产科临床杂志,2018,19(5):394-6.
- [3] 李睿歆,谢庆生,王丽娟,等. miR-182 通过 HES1 调控宫颈癌耐放疗细胞株的上皮间质转化[J]. 中国癌症防治杂志,2018,10(4):278-82.
- [4] SUN H, ZHOU X, BAO Y, et al. Involvement of mir-4262 in paclitaxel resistance through the regulation of pten in non-small cell lung cancer[J]. Open Biol, 2019,9(7):180227-31.
- [5] BAO H, GAO F, XIE G, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 inhibits apoptosis of pulmonary endothelial cells during acute lung injury through suppressing mir-4262[J]. Cell Physiol Biochem, 2015,37(2):759-67.
- [6] CHRISTINA CP, SHAWN MH, CLAYTON, et al. Dancing from bottoms up - Roles of the POZ-ZF transcription factor Kaiso in Cancer[J]. BBA-Reviews on Cancer,2018,3(2):121-6.
- [7] 田芝瑜,李燕娇,刘济豪,等. 青蒿琥酯对人结肠癌细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 中国老年学杂志,2019,39(1):151-4.
- [8] ZHANG HZ, JIANG HJ, ZHANG HX, et al. miR-4262, low level of which predicts poor prognosis, targets proto-oncogene CD163 to suppress cell proliferation and invasion in gastric cancer[J]. Oncother,2019,2(3):225-9.
- [9] ZHANG DW, LI ZJ, ZHANG YF, et al. MiR-4262 promotes the proliferation of human cutaneous malignant melanomacells through KLF6-mediated EGFR inactivation and p21 upregulation [J]. Oncol Rep,2016,36(6):445-50.
- [10] LI W, MA J, JIA YP, et al. MiR-4262 promotes cell apoptosis and inhibits proliferation of colon cancer cells: involvement of GALNT4. [J]. Am J Trans Res,2018,10(12):135-41.
- [11] 王亚男,曹洋. Kaiso 生物学功能及其与肺癌发生发展关系的研究进展[J]. 山东医药,2018,58(21):91-3.
- [12] 王纪莲,付卫. P120 连环蛋白/转录抑制因子 Kaiso 与 Wnt 信号通路在肿瘤发病机制中的作用[J]. 中华普外科手术学杂志(电子版),2017,11(2):177-80.
- [13] DU H, WANG X, DONG R, et al. Mir-601 inhibits proliferation, migration and invasion of prostate cancer stem cells by targeting krt5 to inactivate the wnt signaling pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2019,12(12):4361-79.
- [14] CAI M, SIKONG Y, WANG Q, et al. Gpx3 prevents migration and invasion in gastric cancer by targeting nfsmal ka, cyrillicb/wnt5a/jnk signaling[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2019,12(4):1194-203.
- [15] 周小庆,金丹. 子宫颈癌组织中 RACK1 和 β -catenin 的表达及临床意义[J/OL]. 临床与实验病理学杂志,2019,1(1):56-60.
- [16] 宋殿芳,徐冲. RNA 干扰 STIM1 基因表达抑制宫颈癌细胞增殖侵袭及 Wnt/ β -catenin 信号通路的机制研究[J]. 中国妇幼保健,2018,33(24):5967-70.
- [17] 胡艳萍,吴林林,刘辉,等. β -Catenin 在食管鳞状细胞癌中的表达及相关临床因素分析[J]. 中国医刊,2018,53(12):1367-70.
- [18] 陈利侠,张汝,苏敏君,等. TRPM3 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路诱导上皮性卵巢癌细胞上皮间质转化的作用研究[J]. 现代生物医学进展,2018,18(22):4201-6.

(本文编辑:蒋湘莲)