doi:10.11659/jjssx.07E020084

·基础研究·

miR-196a 通过靶向 NR6A1 降低宫颈癌 Hela 细胞生存和运动能力

梁 燕[1],朱万娇[1],张志苏[2],许 红[2],张 健[2] (1.襄阳市中心医院/湖北文理学院附属医院妇科,湖北 襄阳 441021;2.荆州职业技术学院附属医院妇科,湖北 荆州 434020)

[摘 要] **目的** 探究微小型 RNA-196a(miR-196a)对宫颈癌 Hela 细胞生存和运动能力的影响和作用机制。**方法** RT-PCR 检测正常宫颈上皮 HcerEpic 细胞和宫颈癌 Hela 细胞、CaSki 细胞中 miR-196a 和核受体 NR6A1 的 mRNA 水平;阴性对照 miR-NC 和 miR-196a inhibitor转染 Hela 细胞,分别记为 NC 组和 miR-196a inhibitor 组,免疫印迹检测 NR6A1 蛋白的表达,生物信息学和荧光素酶报告实验分析和验证 miR-196a 和 NR6A1 的靶向调控关系;阴性对照质粒 pcDNA 和过表达质粒 pcDNA-NR6A1 转染 Hela 细胞,分别记为 pcDNA 组和 pcDNA-NR6A1 组,免疫印迹检测 NR6A1 蛋白表达;将 miR-196a inhibitor 和 pcDNA-NR6A1 单独或联合转染 Hela 细胞,分别记为 miR-196a inhibitor 组、pcDNA-NR6A1 组和 inhibitor + NR6A1 组,CCK8 检测细胞增殖情况,流式细胞术检测细胞凋亡情况,Transwell 检测细胞侵袭能力,划痕实验检测细胞迁移能力,免疫印迹检测 Ki-67、Caspase-3、VEGF 和 MMP-9 的表达。**结果** 与HcerEpic 细胞比较,Hela 细胞和 CaSki 细胞中 miR-196a 和 NR6A1 mRNA 表达水平均较高($P<0.01$),Hela 细胞中 miR-196a和 NR6A1 mRNA 表达变化最为显著($P<0.05$);miR-196a inhibitor 组 Hela 细胞中 NR6A1 蛋白表达显著降低($P<0.01$),pcDNA-NR6A1 组 NR6A1 的蛋白表达显著升高($P<0.01$);miR-196a inhibitor 能显著降低 Hela 细胞增殖倍数和 Ki-67 表达水平($P<0.05$),同时还能提高 Hela 细胞凋亡率和 Caspase-3 表达($P<0.01$);此外,miR-196a inhibitor 还能减少侵袭细胞数,降低 Hela 细胞划痕闭合率并抑制 VEGF 和 MMP-9 的表达($P<0.01$);NR6A1 能显著减弱 miR-196a inhibitor 对 Hela 细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移及对 Ki-67、Casapse-3、VEGF 和 MMP-9 表达的调控作用($P<0.01$)。**结论** miR-196a inhibitor 能通过靶向抑制 NR6A1 表达降低宫颈癌 Hela 细胞的生存和运动能力。

[关键词] miR-196a;NR6A1;宫颈癌;Hela 细胞;增殖;迁移;侵袭

[中图分类号] R737.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-07-16

miR-196a reduces the survival and mobility of cervical cancer Hela cells via targeting NR6A1

LIANG Yan[1],ZHU Wan-jiao[1],ZHANG Zhi-su[2],XU Hong[2],ZHANG Jian[2] (1.Department of Gynaecology,Xiangyang Central Hospital/Affiliated Hospital of Hubei University of Arts and Science,Xiangyang Hubei 441021,China;2.Department of Gynaecology,Affiliated Hospital of Jingzhou Institute of Technology,Jingzhou Hubei 434020,China)

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanism of microRNA-196a (miR-196a) on survival and mobility of cervical cancer Hela cells. **Methods** The levels of miR-196a and NR6A1 mRNA in normal cervical epithelial HcerEpic cells and cervical cancer Hela and CaSki cells were detected by RT-PCR. Negative control miR-NC and miR-196a inhibitor were transfected into Hela cells,denoted as NC group and miR-196a inhibitor group respectively. The protein level of NR6A1 was detected by Western blot;bioinformatics and luciferase report experiments were used to analyze and verify the targeted regulation relationship between miR-196a and NR6A1. Negative control plasmid pcDNA and overexpression plasmid pcDNA- NR6A1 were transfected into Hela cells,which were denoted as pcDNA group and pcDNA-NR6A1 group respectively,and the expression of NR6A1 was detected by Western blot. The miR-196a inhibitor and pcDNA-NR6A1 were transfected into Hela cells alone or in combination,and the transfected Hela cells were denoted as miR-196a inhibitor group,pcDNA-NR6A1 group and inhibitor + NR6A1 group,respectively. CCK8 assay was performed to detect cell proliferation,flow cytometry was used to detect cell apoptosis,Transwell assay was performed to detect cell invasive ability,wound healing assay was performed to detect cell migration,and Western blot was used to detect the expressions of Ki-67,Caspase-3,VEGF and MMP-9. **Results** Compared with HcerEpic cells,the expression levels of miR-196a and NR6A1 mRNA in Hela cells and CaSki cells were higher ($P<0.01$),and the expression of miR-196a and NR6A1 mRNA in Hela cells changed most significantly ($P<0.05$). The expression of NR6A1 protein in Hela cells in the miR-196a inhibitor group was significantly reduced ($P<0.01$),while it was significantly increased in pcDNA-NR6A1 group ($P<0.01$). miR-196a inhibitor significantly decreased the proliferation times and the level of Ki-67($P<0.05$),and increased the apoptosis rate of Hela cells and protein level of Caspase-3($P<0.01$). In addition,miR-196a inhibitor decreased the number of invasive cells and wound closure rate,and inhibited the

[基金项目] 湖北省自然科学基金(2017CFB615)

[通信作者] 朱万娇,E-mail:zhuwanjiao112@163.com

expressions of VEGF and MMP-9($P<0.01$). NR6A1 significantly alleviated the effects of miR-196a inhibitor on proliferation, apoptosis, invasion, migration and the expressions of Ki-67, Caspase-3, VEGF and MMP-9 in Hela cells($P<0.01$). **Conclusion** miR-196a inhibitor reduces the survival and mobility of cervical cancer Hela cells through targeted inhibiting the expression of NR6A1.

Keywords: miR-196a; NR6A1; cervical cancer; Hela cells; proliferation; migration; invasion

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一,也是导致发展中国家女性死亡的主要原因[1-2]。据统计,全球宫颈癌患者超过 50 万,其中 80% 的患者来自发展中国家[3-4]。手术和放化疗仍是治疗宫颈癌的主要方法,但二者均不能有效降低宫颈癌的致死率。因此,探究宫颈癌的发生发展机制、寻找根治宫颈癌的方法是目前的研究热点。有研究表明,微小型 RNA(microRNA,miRNA)在癌症中的异常表达及其对下游靶蛋白表达的调控在癌症的发生发展过程中发挥了重要作用,既可诱导癌症的发生发展又能抑制癌症的恶化[5]。miR-196a 是一类具有抑癌和诱导癌症发生发展双向作用的 miRNA。研究显示,miR-196a 在乳腺癌细胞中呈低表达状态,上调 miR-196a 表达能显著抑制癌细胞的侵袭和迁移[6]。而 miR-196a 在宫颈癌细胞中呈高表达状态,下调 miR-196a 表达可抑制宫颈癌细胞增殖[7]。NR6A1 是一类生殖细胞核因子,在胚胎发育过程中具有重要作用[8]。有研究表明,NR6A1 在肿瘤细胞中呈高表达状态,可能与癌症的发生发展密切相关,并且生物信息预测表明 NR6A1 可能是miR-196a的下游靶标[9]。但 miR-196a 能否通过调控 NR6A1 的表达影响宫颈癌的发生发展还未见报道。因此,本研究以宫颈癌 Hela 细胞为研究对象,探究 miR-196a 与 NR6A1 的靶向关系及其对宫颈癌 Hela 细胞生存和运动能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

细胞培养液 RPMI 1640 和胎牛血清购自美国 Gibco公司。反转录试剂盒、荧光定量试剂盒、荧光素酶报告试剂盒和 Lipofectamine 2000™ 均购自美国 Invitrogen公司。TRIzol 试剂盒、BCA 试剂盒和 RIPA 裂解液购自北京索莱宝生物科技公司。CCK8 试剂盒和 Annexin V-FITC 购自美国 ThermoFisher 生物公司。GAPDH、NR6A1、Ki-67、MMP-9、Caspase-3 和 VEGF 一抗购自美国 CST 公司,二抗购自美国 Santa Cruz 公司。miR-NC、miR-196a inhibitor、mimic-NC、miR-196a mimic 和 pcDNA- NR6A1 均由美国 Invitrogen 公司设计合成。

1.2 细胞来源及培养

正常宫颈上皮 HcerEpic 细胞和宫颈癌 Hela 细胞、CaSki细胞由中国科学院上海细胞库提供。将上述细胞接种于培养瓶或培养板中,用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,隔天换液,2 ~ 3 d 传代 1 次,细胞传代密度为 1×10^4/mL,取第 3 ~ 5 代细胞进行实验。

1.3 RT-PCR 检测 miR-196a 和 NR6A1 mRNA 表达

用 TRIzol 试剂盒提取正常宫颈上皮 HcerEpic 细胞和宫颈癌 Hela 细胞、CaSki 细胞的总 RNA,用反转录试剂盒合成 cDNA,并用 PCR 仪进行扩增。根据荧光定量试剂盒说明书对 cDNA 进行定量分析,miR-196a 以 U6 为内参,NR6A1 以 GAPDH 为内参,$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-196a 和 NR6A1 相对表达水平。反应程序:95 ℃ 30 s,95 ℃ 3 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。实验所用引物均采用 Primer 5 进行设计,由上海生工合成。NR6A1 正向引物 5'-GGGATGAACCGGAAGGCTATC-3',NR6A1 反向引物 5'-GGCTGGTTGCTCTCCGAAG-3';miR-196a 正向引物 5'-CCGACGTAGGTAGTTTCATGTT-3',miR-196a 反向引物 5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3';U6 正向引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACAR-3';U6 反向引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';GAPDH 正向引物 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',GAPDH 反向引物 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCA-3'。

1.4 细胞转染

根据说明书用 Lipofectamine 2000™ 将 miR-NC、miR-196a inhibitor、阴性对照质粒 pcDNA、过表达质粒 pcDNA-NR6A1、inhibitor + NR6A1 转染到 Hela 细胞中,分别命名为 NC 组、miR-196a inhibitor 组、pcDNA 组、pcDNA-NR6A1 组、inhibitor + NR6A1 组。Control 组则仅加入 Lipofectamine 2000™。转染 6 h 后将转染液更换为正常细胞培养液进行培养,24 h 后进行相应检测。

1.5 荧光素酶报告实验

利用生物信息预测网站预测 NR6A1 3'UTR 序列上 miR-196a 的结合位点,用 PCR 将结合片段进行扩增并插入到荧光素酶载体中,构建 NR6A1 野生质粒(NR6A1 + wt)。随后利用基因突变技术将 NR6A1 3'UTR与 miR-196a 的结合位点突变并克隆到载体中,构建 NR6A1 突变质粒(NR6A1 + mut)。用 miR-196a mimic 或其阴性对照 mimic-NC 联合 NR6A1 野生质粒

或突变质粒转染 Hela 细胞,根据荧光素酶基因报告试剂盒说明书检测各组细胞荧光素酶活性。

1.6 CCK8 检测细胞活性

将传代至第 3 ~5 代的 Hela 细胞接种于 96 孔板内,并按照 1.4 项下方法转染,各组连续培养 1 d、2 d、3 d、4 d,每孔加入 10 μL 的 CCK8 试剂,于培养箱继续培养 24 h 后用酶标仪检测各组细胞吸光度,计算细胞增殖倍数。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡

转染后约 48 h 收集各组细胞,PBS 洗涤细胞,并用膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)和碘化丙啶(PI)染色,4 ℃避光孵育 10 min,随后上机检测细胞凋亡率。细胞凋亡率 =(凋亡细胞数/总细胞数)×100%。

1.8 Transwell 检测细胞侵袭能力

将按照 1.4 项下方法转染后的各组细胞接种到用基质胶包被的 Transwell 小室上层中,密度为 1×10^6/mL,用无血清培养液进行培养,小室下层则加入正常培养液进行培养。连续培养 24 h 后用无菌棉签擦去上层未穿膜细胞,0.5% 结晶紫对下层迁移细胞进行染色,并进行计数统计。

1.9 划痕实验检测细胞迁移能力

实验前 1 d 用记号笔于 12 孔板背面划平行直线,至少有 3 条直线穿过每个培养孔。第 2 天将 Hela 细胞以 5×10^4/mL 的密度接种于 12 孔板内,并按照 1.4 项下方法转染细胞,6 h 后用 10 μL 枪头垂直于培养板正面直线划痕,并用 PBS 洗涤,0.5% 结晶紫悬浮细胞,加入无血清培养液继续培养 24 h,显微镜下观察细胞迁移情况,并计算细胞迁移率。

1.10 免疫印迹检测 NR6A1 蛋白表达

按照 1.4 项下方法处理细胞 48 h 后,收集细胞,用 RIPA 裂解液提取各组细胞蛋白,用 BCA 试剂盒检测总蛋白浓度。将蛋白浓度调平后用 10% SDS-PAGE 分离蛋白并转移到 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭蛋白2 h,随后加入一抗 GAPDH(1∶1 000)、NR6A1(1∶1 000)、Ki-67(1∶1 000)、MMP-9(1∶1 000)、Caspase-3(1∶1 000)和 VEGF(1∶1 000)于 4 ℃封闭过夜。第 2 天用 TBST 洗去未结合一抗,加入山羊抗兔二抗(1∶2 000)室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,每次 10 min,加入化学发光显色液于暗室曝光显影。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行统计分析,以 *Student's t* 检验和单因素方差分析对实验数据进行比较分析。所有实验结果均以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,$P<0.01$ 为差异有极显著性统计学意义。

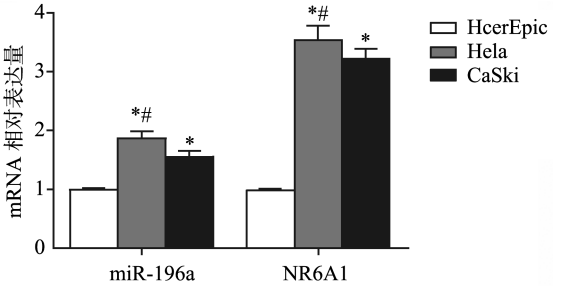
2 结果

2.1 宫颈癌细胞中 miR-196a 和 NR6A1 mRNA 的表达

RT-PCR 实验结果表明,宫颈癌 Hela 细胞和 CaSki 细胞中 miR-196a 和 NR6A1 mRNA 表达量均明显高于正常宫颈上皮 HcerEpic 细胞($P<0.01$),且以 Hela 细胞中 miR-196a 和 NR6A1 mRNA 表达量最高($P<0.05$),见图 1。因此,选择 Hela 细胞进行后续实验。

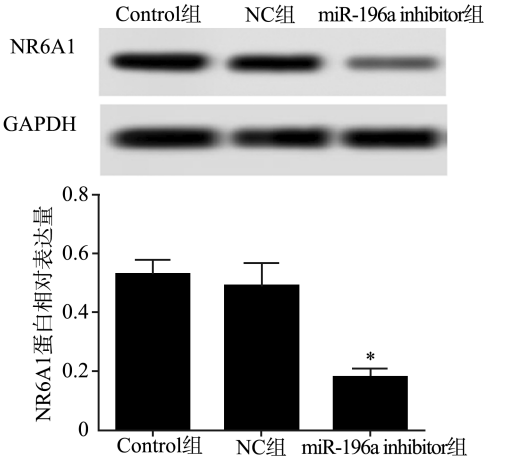
2.2 miR-196a 与 NR6A1 的靶向关系

与 Control 组比较,NC 组 Hela 细胞 NR6A1 蛋白表达水平无明显变化($P>0.05$),miR-196a inhibitor 组 NR6A1 蛋白表达水平明显较低($P<0.01$),提示 miR-196a 能调控 NR6A1 表达(图 2)。生物信息预测结果表明,NR6A1 基因序列上有 miR-196a 的靶向结合位点;此外,荧光素酶报告实验结果表明,miR-196a inhibitor 能显著降低 NR6A1 野生质粒的荧光素酶活性($P<0.01$),但对 NR6A1 突变质粒的荧光素酶活性无明显影响($P>0.05$),提示miR-196a可靶向调控 NR6A1 表达(图 3)。



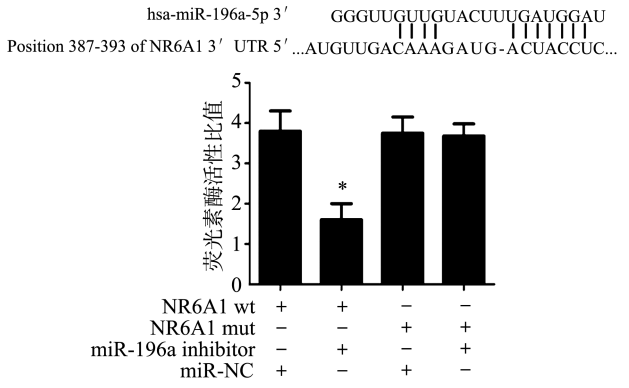
*:与 HcerEpic 组比较,$P<0.01$;#:与 CaSki 组比较,$P<0.05$

图 1 miR-196a 和 NR6A1 mRNA 在 HcerEpic、Hela 和 CaSki 细胞中的表达



*:与 Control 组比较,$P<0.01$

图 2 miR-196a 对 Hela 细胞 NR6A1 蛋白表达水平的影响



*:与 NR6A1 wt + miR-NC 组比较,$P<0.01$

图 3 miR-196a 与 NR6A1 的靶向关系

2.3 下调 miR-196a 表达对宫颈癌细胞增殖的影响

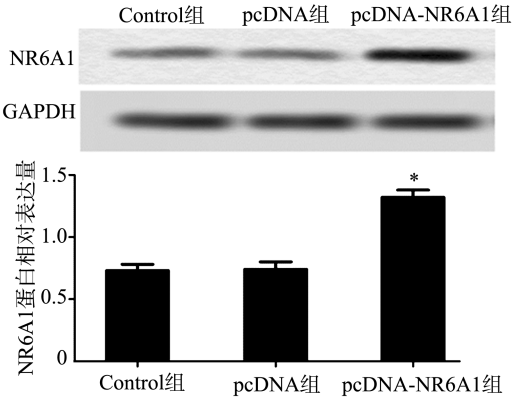
pcDNA-NR6A1 能显著提高 Hela 细胞中 NR6A1 蛋白表达水平($P<0.01$),见图 4,表明转染成功;转染细胞 4 d 后,与 Control 组比较,miR-196a inhibitor 组细胞增殖倍数明显较低($P<0.01$),pcDNA-NR6A1 组细胞增殖倍数显著较高($P<0.01$);与 miR-196a inhibitor 组比较,inhibitor + NR6A1 组细胞增殖倍数显著较高($P<0.01$),见图 5,表明 miR-196a inhibitor 能通过下调 NR6A1 表达抑制 Hela 细胞增殖。

2.4 下调 miR-196a 表达对细胞凋亡的影响

流式细胞术实验结果表明,miR-196a inhibitor 能显著提高 Hela 细胞凋亡率,pcDNA-NR6A1 能显著降低 Hela 细胞凋亡率,与 Control 组比较差异有统计学意义($P<0.05$);与 miR-196a inhibitor 组比较,inhibitor + NR6A1 组细胞凋亡率明显较低($P<0.01$),见图 6。免疫印迹实验结果显示,miR-196 inhibitor 组 Caspase-3 表达较高,pcDNA-NR6A1 组 Caspase-3 表达较低,与 Control 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 7。

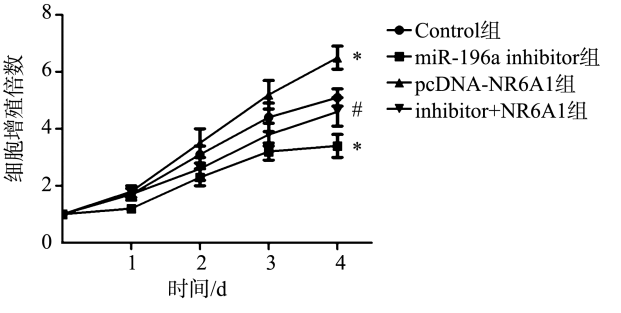
2.5 下调 miR-196a 表达对宫颈癌细胞侵袭及迁移能力的影响

与 Control 组比较,miR-196a inhibitor 组侵袭细胞数明显较少($P<0.01$),pcDNA-NR6A1 组侵袭细胞数明显较多($P<0.01$);与 miR-196a inhibitor 组比较,inhibitor + NR6A1 组侵袭细胞数明显较多($P<0.01$),见图 8。同时,miR-196a inhibitor 组细胞划痕闭合率显著低于 Control 组($P<0.01$),pcDNA-NR6A1 组细胞划痕闭合率显著高于 Control 组($P<0.05$);inhibitor + NR6A1 组细胞划痕闭合率显著高于 miR-196a inhibitor 组($P<0.01$),见图 9。此外,miR-196a inhibitor 还能显著抑制 Hela 细胞中 Ki-67、VEGF 和 MMP-9 的表达($P<0.01$),pcDNA-NR6A1 显著促进 Ki-67、VEGF 和 MMP-9 的表达($P<0.05$),inhibitor + NR6A1 能显著减弱 miR-196a inhibitor 对 Hela 细胞中 Ki-67、VEGF 和 MMP-9 表达的抑制作用($P<0.01$),表明 miR-196a 可通过靶向上调 NR6A1 表达促进 Hela 细胞侵袭和迁移,见图 7。



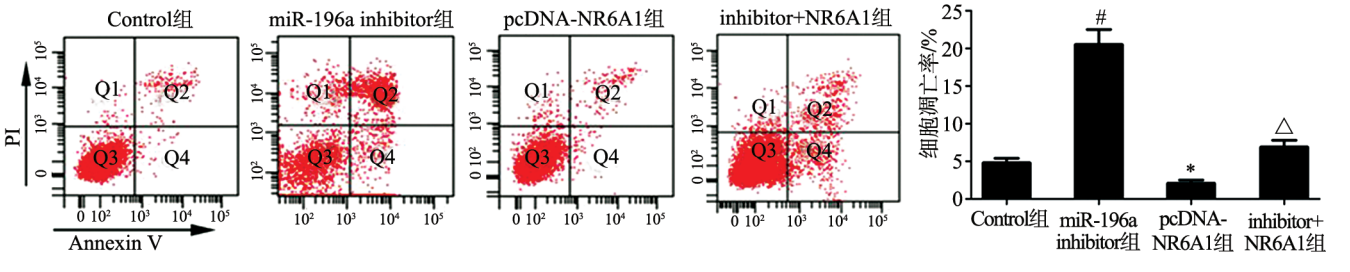
*:与 Control 组比较,$P<0.01$

图 4 NR6A1 对 Hela 细胞 NR6A1 表达的影响



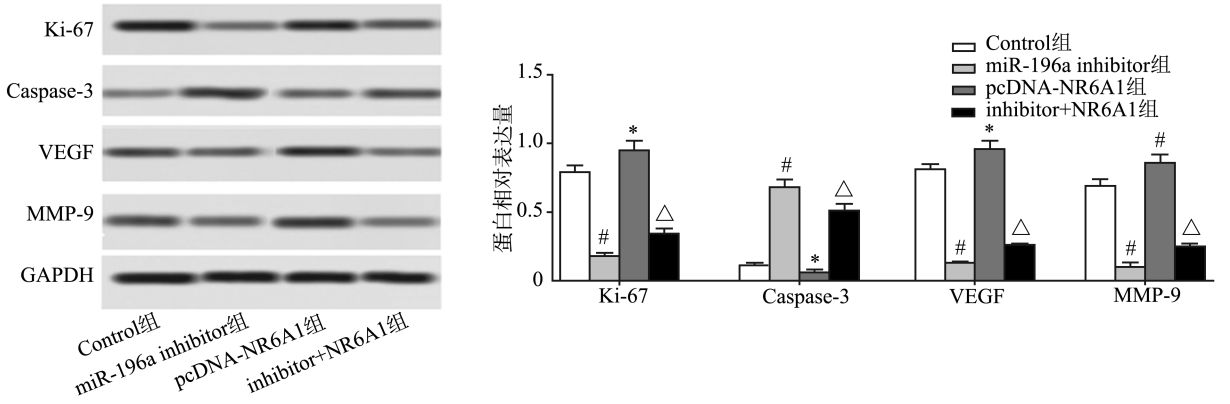
*:与 Control 组比较,$P<0.01$;#:与 miR-196a inhibitor 组比较,$P<0.01$

图 5 miR-196a 对 Hela 细胞增殖的影响



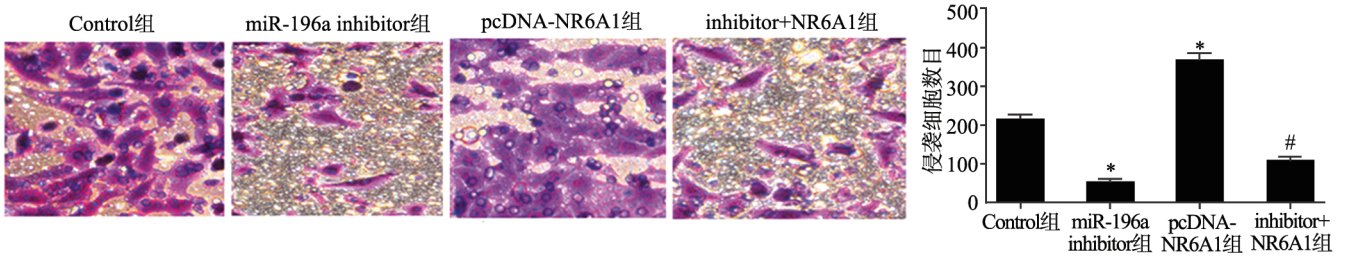
*:与 Control 组比较,$P<0.05$;#:与 Control 组比较,$P<0.01$;△:与 miR-196a inhibitor 组比较 $P<0.01$

图 6 miR-196a 对 Hela 细胞凋亡的影响



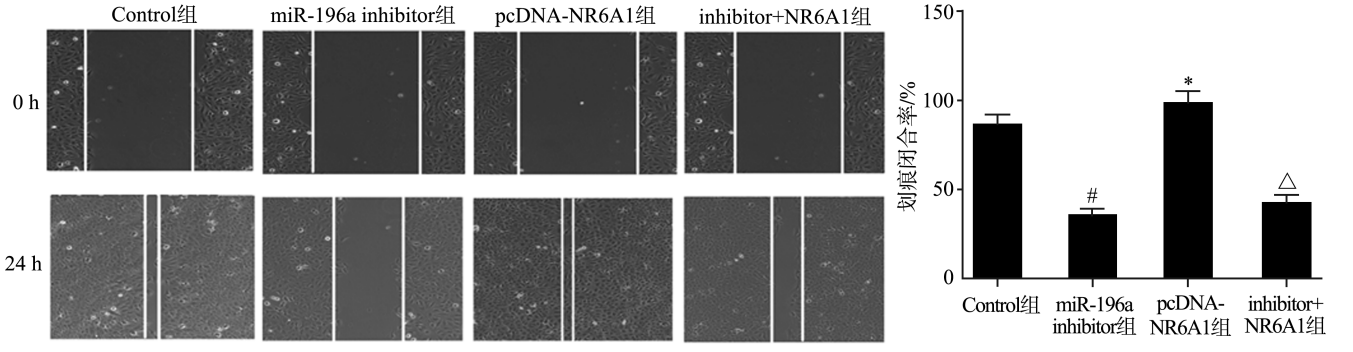
*:与 Control 组比较,$P<0.05$;#:与 Control 组比较,$P<0.01$;△:与 miR-196a inhibitor 组比较,$P<0.01$

图 7 miR-196a 对 Ki-67、Caspas-3、VEGF 和 MMP-9 表达的影响



*:与 Control 组比较,$P<0.01$;#:与 miR-196a inhibitor 组比较,$P<0.01$

图 8 miR-196a 对 Hela 细胞侵袭能力的影响(×400)



*:与 Control 组比较,$P<0.05$;#:与 Control 组比较,$P<0.01$;△:与 miR-196a inhibitor 组比较,$P<0.01$

图 9 miR-196a 对 Hela 细胞迁移能力的影响

3 讨论

miR-196a 是一类位于脊椎动物 HOX 基因簇区域的 miRNA,主要调控胚胎发育过程中同源转录因子的编码,从而调控基因的遗传表达[7,10]。近年来研究表明,miR-196a 参与癌症的发生发展。miR-196a 在胃癌、胰腺癌及口腔癌细胞及组织中均呈高表达状态,提示 miR-196a 可能具有致癌作用[11-13]。本研究发现,miR-196a 在宫颈癌 Hela 细胞中的表达水平明显高于正常宫颈上皮细胞,表明 miR-196a 可作为宫颈癌发生及恶化的指标。研究表明,miR-196a 通过靶向 LRIG3 来促进子宫颈癌细胞的增殖和迁移[14]。本研究发现,miR-196a inhibitor 能显著降低宫颈癌 Hela 细胞的增殖倍数及细胞增殖蛋白 Ki-67 的表达,还能显著增加癌细胞凋亡率,提高凋亡相关蛋白 Caspase-3 的表达,并抑制癌细胞侵袭和迁移,进一步表明 miR-196a 在宫颈癌中发挥着致癌作用,但其具体的作用机制有待进一步探讨。

一项研究表明,miRNAs 主要通过与靶向蛋白基因 3'-UTR 段结合调控靶向基因转录[15]。因此,探讨 miR-196a 的靶向基因是了解 miR-196a 在宫颈癌中致癌作用机制的关键。在上皮性卵巢癌中,miR-196a 可通过靶向下调 HOXA10 的表达促进卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭和迁移[16];在头颈部鳞状细胞癌中,miR-196a 可通过下调 IκBα 表达促进胶质母细胞瘤的癌细胞增殖、侵袭和迁移,并诱导癌细胞上皮间质转化的发生及

放疗抵抗的形成[17];Feng 等[18]的研究表明,miR-196a 可通过靶向 SFRP1 促进胃癌细胞侵袭和转移;Villegas-Ruiz 等[19]的研究表明,miR-196a 还可通过抑制 HOXC8 影响宫颈癌细胞的增殖。每一个 miRNA 均有成百上千个靶向蛋白,miRNAs 的功能及靶向蛋白还与特定的病理生理情况有关[20]。因此,进一步探讨 miR-196a 对宫颈癌细胞生存及运动过程相关靶向蛋白的影响,有利于了解宫颈癌的发病机制。

生殖细胞核受体 NR6A1 是一类转录抑制因子,在小鼠胚胎发育、神经再生和配子形成过程中发挥着重要作用[21],并且在前列腺癌及膀胱癌中均呈高表达状态[22]。本研究发现,NR6A1 在宫颈癌 Hela 细胞中表达水平明显升高,其可能参与了宫颈上皮细胞的异常分化,与宫颈癌的发生发展有关。进一步研究发现,NR6A1 高表达能促进宫颈癌 Hela 细胞增殖、侵袭和迁移,并抑制癌细胞凋亡。本研究发现,抑制 miR-196a 表达能下调 Hela 细胞中 NR6A1 的表达水平,上调 miR-196a 表达能显著诱导 NR6A1 表达,提示 miR-196a 可能靶向调控 NR6A1 表达。通过生物信息预测发现,NR6A1 基因序列上有连续的 miR-196a 结合位点,荧光素酶报告实验也进一步证明 miR-196a 可靶向调控 NR6A1 的表达。本研究表明,上调 NR6A1 表达能显著减弱 miR-196a inhibitor 对宫颈癌 Hela 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的调控作用,并显著减弱 miR-196a inhibitor 对 Ki-67、VEGF 和 MMP-9 表达的抑制作用。Ki-67 抗原是一种与细胞增殖相关的核蛋白,在肿瘤细胞增殖活性的检测中,Ki-67 是最可靠的指标之一[23]。VEGF 是一种高度特异性的促血管生成因子,在多种恶性肿瘤中高表达,可促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移[24]。MMP-9 作为 MMPs 家族的成员,是一种重要的细胞外基质蛋白水解酶,能够水解基膜,从而促进肿瘤迁移[25]。因此,miR-196a 对宫颈癌 Hela 细胞生存和运动能力的影响与靶向调控 NR6A1 表达有关。

综上所述,下调 miR-196a 表达能降低宫颈癌细胞增殖倍数、侵袭细胞数和细胞划痕闭合率,并显著提高癌细胞凋亡率;同时,进一步上调 NR6A1 表达能显著减弱 miR-196a 对宫颈癌 Hela 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的调控作用。提示 miR-196a 能通过促进 NR6A1 表达在宫颈癌中发挥致癌作用,下调 miR-196a 表达能够抑制 NR6A1 表达,从而延缓宫颈癌的发展。本研究首次探讨了 miR-196a 与 NR6A1 的靶向关系及 miR-196a 通过靶向 NR6A1 在宫颈癌中的作用,为宫颈癌发生发展机制的探究提供了新的方向。

[参考文献]

[1] Small W Jr, Bacon MA, Bajaj A, et al. Cervical cancer: a global health crisis[J]. Cancer, 2017, 123(13): 2404 - 2412. doi: 10.1002/cncr.30667.

[2] Xiong Y, Sun F, Dong PX, et al. iASPP induces EMT and cisplatin resistance in human cervical cancer through miR-20a-FBXL5/BTG3 signaling[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 48. doi: 10.1186/s13046 - 017 - 0520 - 6.

[3] Li M, Feng YM, Fang SQ. Overexpression of ezrin and galectin-3 as predictors of poor prognosis of cervical cancer[J]. Braz J Med Biol Res, 2017, 50(4): e5356. doi: 10.1590/1414 - 431x20165356.

[4] Wei W, Liu C. Prognostic and predictive roles of microRNA-411 and its target STK17A in evaluating radiotherapy efficacy and their effects on cell migration and invasion via the p53 signaling pathway in cervical cancer[J]. Mol Med Rep, 2020, 21(1): 267 - 281. doi: 10.3892/mmr.2019.10826.

[5] Hou T, Ou J, Zhao X, et al. MicroRNA-196a promotes cervical cancer proliferation through the regulation of FOXO1 and p27Kip1[J]. Br J Cancer, 2014, 110(5): 1260 - 1268. doi: 10.1038/bjc.2013.829.

[6] Yang B, Li SZ, Ma L, et al. Expression and mechanism of action of miR-196a in epithelial ovarian cancer[J]. Asian Pac J Trop Med, 2016, 9(11): 1082 - 1087. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.09.002.

[7] Yang WW, Hong L, Xu XX, et al. LncRNA GAS5 suppresses the tumorigenesis of cervical cancer by downregulating miR-196a and miR-205[J]. Tumour Biol, 2017, 39(7): 1010428317711315. doi: 10.1177/1010428317711315.

[8] Willis S, De P, Dey N, et al. Enriched transcription factor signatures in triple negative breast cancer indicates possible targeted therapies with existing drugs[J]. Meta Gene, 2015, 4: 129 - 141. doi: 10.1016/j.mgene.2015.04.002.

[9] Liu P, Xin F, Ma CF. Clinical significance of serum miR-196a in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 17995 - 18002. doi: 10.4238/2015.December.22.25.

[10] Lu YC, Chang TC, Huang YC, et al. Combined determination of circulating miR-196a and miR-196b levels produces high sensitivity and specificity for early detection of oral cancer[J]. Clin Biochem, 2015, 48(3): 115 - 121. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.11.020.

[11] Li HL, Xie SP, Yang YL, et al. Clinical significance of upregulation of mir-196a-5p in gastric cancer and enriched KEGG pathway analysis of target genes[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(5): 1781 - 1787. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.5.1781.

[12] Xu YF, Hannafon BN, Zhao YD, et al. Plasma exosome miR-196a and miR-1246 are potential indicators of localized pancreatic cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(44): 77028 - 77040. doi: 10.18632/oncotarget.20332.

[13] Tsai SC, Huang SF, Chiang JH, et al. The differential regulation of microRNAs is associated with oral cancer[J]. Oncol Rep, 2017, 38(3): 1613 - 1620. doi: 10.3892/or.2017.5811.

[14] Qiu YF, Han Q, Lu H, et al. miR-196a targeting LRIG3 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells[J]. Cell Mol Biol (Noisy - le - grand), 2020, 66(7): 180 - 185.

doi:10.11659/jjssx.08E020071

·基础研究·

抗生素复合骨水泥洗脱特性的实验研究

宋夏楠,周大鹏,刘欣伟,刘 兵,纪振钢,韩天宇 (北部战区总医院骨科,辽宁 沈阳 110016)

[摘 要] **目的** 探讨将2种抗生素混入骨水泥时抗生素释放特性的变化。**方法** 骨水泥样品分为单一万古霉素组(40 g PMMA骨水泥中混入2 g万古霉素)、单一头孢他啶组(40 g PMMA骨水泥中混入2 g头孢他啶)和联合组(40 g PMMA骨水泥中混入2 g万古霉素+2 g头孢他啶),每组6个。抗生素骨水泥载体在体外用PBS缓冲液浸泡,取4 h、8 h、16 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、2周、3周、4周、6周样本,并应用高效液相色谱仪测定抗生素洗脱浓度。**结果** 在为期6周的洗脱过程中,联合组万古霉素及头孢他啶在骨水泥载体中的洗脱浓度分别高于单一万古霉素组和单一头孢他啶组($P<0.05$)。**结论** 2种抗生素添加于骨水泥载体中,可更好地发挥其功效。

[关键词] 抗生素;骨水泥;感染;释放特性

[中图分类号] R684 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-08-20

Experimental study on elution characteristics of bone cement loaded with antibiotics

SONG Xia-nan, ZHOU Da-peng, LIU Xin-wei, Liu Bing, JI Zhen-gang, HAN Tian-yu (Department of Orthopedics, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang Liaoning 110016, China)

Abstract: Objective To investigate the elution characteristics of the 2 mixed antibiotics loaded into bone cements. **Methods** Bone cements were divided into single vancomycin group (2 g of vancomycin loaded into 40 g of PMMA bone cements), single ceftazidime group (2 g of ceftazidime loaded into 40 g of PMMA bone cements) and combination group (2 g of vancomycin + 2 g of ceftazidime loaded into 40 g of PMMA bone cements), with 6 samples in each group. Bone cements were immersed in phosphate buffered saline in vitro. Samples were taken in the 4th hour, 8th hour, 16th hour, 24th hour, 2nd day, 3rd day, 4th day, 5th day, 6th day, 7th day, 2nd week, 3rd week, 4th week and

[基金项目] 辽宁省自然科学基金(20180551082);辽宁省自然科学基金(20180550361)

[通信作者] 韩天宇,E-mail:fmmuhty@sina.com

[15] 孙宝峰,樊 芳,李忠勇,等. CDKN2B-AS1靶向miR-411-3p调节乳腺癌细胞的生物学行为[J]. 医学分子生物学杂志,2020,17(1):26-32. doi:10.3870/j.issn.1672-8009.2019.01.005.

[16] Suh YE, Raulf N, Gäken J, et al. MicroRNA-196a promotes an oncogenic effect in head and neck cancer cells by suppressing annexin A1 and enhancing radioresistance[J]. Int J Cancer, 2015, 137(5): 1021-1034. doi:10.1002/ijc.29397.

[17] Yang G, Han D, Chen X, et al. MiR-196a exerts its oncogenic effect in glioblastoma multiforme by inhibition of $I_{\kappa}B\alpha$ both in vitro and in vivo [J]. Neuro Oncol, 2014, 16(5): 652-661. doi: 10.1093/neuonc/not307.

[18] Feng C, She J, Chen X, et al. Exosomal miR-196a-1 promotes gastric cancer cell invasion and metastasis by targeting SFRP1 [J]. Nanomedicine (Lond), 2019, 14(19): 2579-2593. doi:10.2217/nnm-2019-0053.

[19] Villegas-Ruiz V, Juárez-Méndez S, Pérez-González OA, et al. Heterogeneity of microRNAs expression in cervical cancer cells: over-expression of miR-196a[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(4): 1389-1401.

[20] Benmoshe NB, Avraham R, Kedmi M, et al. Context-specific microRNA analysis: identification of functional microRNAs and their mRNA targets[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(21): 10614-10627. doi: 10.1093/nar/gks841.

[21] Mathieu R, Evrard B, Fromont G, et al. Expression screening of cancer/testis genes in prostate cancer identifies NR6A1 as a novel marker of disease progression and aggressiveness[J]. Prostate, 2013, 73(10): 1103-1114. doi:10.1002/pros.22659.

[22] Cheng G, Wang S, Li X, et al. Positive expression of NR6A1/CT150 as a predictor of biochemical recurrence-free survival in prostate cancer patients[J]. Oncotarget, 2016, 8(38): 64427-64439. doi: 10.18632/oncotarget.11749.

[23] 刘 法,郝 静,陈志杰,等. 贝伐单抗对视网膜母细胞瘤荷瘤裸鼠的影响及机制探讨[J]. 局解手术学杂志,2020,29(10):780-784. doi:10.11659/jjssx.11E019108.

[24] 牛 越,王占英,范立娜,等. miR-140-5p靶向ADAM9抑制乳腺癌细胞侵袭和迁移的研究[J]. 医学分子生物学杂志,2020,17(3):181-186. doi:10.3870/j.issn.1672-8009.2020.03.002.

[25] 周 亮,陈其玖,张建勇,等. 浸润性肺腺癌术后组织中跨膜蛋白-1及其受体和基质金属蛋白酶-9表达及关系[J]. 中国老年学杂志,2018,38(8):46-48. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2018.08.018.

(编辑:魏 源)