

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.18.002

miR-142 通过靶向 HMGB1 对宫颈癌细胞生物学行为影响的实验研究 *

朱争艳¹ 郭静秋¹ 陈雪梅¹ 刘和宇¹ 宋玉¹ 雷磊^{2Δ}

(1 武汉大学附属同仁医院光谷院区光谷妇科 湖北 武汉 430074; 2 湖南中医药大学中西医结合妇产科教研室 湖南 长沙 410208)

摘要 目的:通过实验探究 miR-142 靶向高迁移率族蛋白 1(high-mobility group box 1 protein, HMGB1)对宫颈癌(cervical cancer, CC)细胞生物学行为的影响及其潜在的作用机制。**方法:**采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)和蛋白质免疫印迹法(Western Blot)检测 CC 组织和正常组织中 miR-142 和 HMGB1 mRNA 及蛋白表达水平,采用荧光素酶报告实验分析 miR-142 与 HMGB1 的靶向关系,CCK-8 法检测 CC 细胞生存能力,克隆形成实验检测 CC 细胞增殖能力,划痕修复实验检测 CC 细胞迁移能力,基质胶侵袭实验检测 CC 细胞侵袭能力。**结果:**CC 组 miR-142 mRNA 和蛋白表达水平显著低于正常组($P<0.05$),HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平显著高于正常组($P<0.05$),且 CC 癌组织中 miR-142 和 HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平均呈显著负相关($r=-0.399, P=0.002$; $r=-0.429, P=0.001$);miR-142 与 HMGB1 存在靶向关系;CCK-8 法实验、克隆形成实验、划痕修复实验和基质胶侵袭实验结果显示,miR-142 mimic 组细胞生存、增殖、迁移和侵袭能力显著低于 miR-NC 组($P<0.05$),miR-142 inhibitor 组细胞生存、增殖、迁移和侵袭能力显著高于 miR-NC 组;Western Blot 实验结果显示,HMGB1 过表达时 miR-142 mimic+plasmid 组 HMGB1 蛋白表达水平显著高于 miR-142 mimic+control plasmid 组($P<0.05$),显著低于 miR-NC+plasmid 组($P<0.05$);CCK-8 法实验、克隆形成实验、划痕修复实验和基质胶侵袭实验结果显示,HMGB1 过表达时 miR-142 mimic+plasmid 组细胞生存、增殖、迁移和侵袭能力显著高于 miR-142 mimic+control plasmid 组($P<0.05$),显著低于 miR-NC+plasmid 组($P<0.05$)。**结论:**miR-142 可通过靶向负调控 HMGB1 表达,进而抑制 CC 细胞生存、增殖、迁移和侵袭。

关键词:miR-142;高迁移率族蛋白 1;宫颈癌;细胞生物学

中图分类号:R-33;R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)18-3406-07

Experimental Study of miR-142 Targeting HMGB1 on Biological Behaviors of Cervical Cancer Cells*

ZHU Zheng-yan¹, GUO Jing-qiu¹, CHEN Xue-mei¹, LIU He-yu¹, SONG Yu¹, LEI Lei^{2Δ}

(1 Department of Gynecology, Optics Valley, Tongren Hospital, Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430074, China;

2 Department of Obstetrics and Gynecology, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan, 410208, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of miR-142 targeting high mobility group protein 1 (HMGB1) on biological behaviors of cervical cancer (CC) cells and its potential role mechanism through experiments. **Methods:** Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR) and Western Blot were used to detect the mRNA and protein expression levels of miR-142 and HMGB1 in CC tissues and normal tissues, and luciferase reporter assay was used to analyze the targeting relationship between miR-142 and HMGB1. CCK-8 assay was used to detect the viability of CC cells, and clone formation assay was used to detect the proliferation ability of CC cells, and scratch repair test was used to detect the migration ability of CC cells, and matrigel invasion test was used to detect the invasion ability of CC cells. **Results:** The mRNA and protein expression levels of miR-142 in CC group were significantly lower than those in normal group ($P<0.05$) while the mRNA and protein expression levels of HMGB1 were significantly higher than those in normal group ($P<0.05$), and the miR-142 in CC cancer tissues was significantly negatively correlated with mRNA and protein expression levels of HMGB1 ($r=-0.399, P=0.002$; $r=-0.429, P=0.001$). miR-142 had a targeting relationship with HMGB1. Results of CCK-8 assay, clone formation assay, scratch repair test and matrigel invasion test showed that the cell viability, proliferation, migration and invasion in miR-142 mimic group were significantly lower than those in miR-NC group ($P<0.05$), and the cell viability, proliferation, migration and invasion in miR-142 inhibitor group were significantly higher than those in miR-NC group. Western Blot results showed that when HMGB1 was over-expressed, the protein expression level of HMGB1 in miR-142 mimic+plasmid group was significantly higher than that in miR-142 mimic+control plasmid group ($P<0.05$), and was significantly lower than that in miR-NC+plasmid group ($P<0.05$). Results of CCK-8 assay, clone formation assay, scratch repair test and matrigel invasion test showed that when HMGB1 was over-expressed, the cell viability, proliferation, migration and invasion in miR-142 mimic+plasmid group were significantly higher than those in miR-142 mimic+control plasmid group ($P<0.05$).

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(30973771);武汉市卫生和计划生育委员会科研项目(WZ18Q04)

作者简介:朱争艳(1981-),女,硕士,主治医师,研究方向:妇科生殖内分泌,电话:13618601816, E-mail: zzyjulieyan@163.com

Δ 通讯作者:雷磊(1963-),男,博士,教授,研究方向:妇科内分泌,电话:13874804056, E-mail: zzyjulieyan@163.com

(收稿日期:2021-04-07 接受日期:2021-04-28)

05), and were significantly lower than those in miR-NC+plasmid group ($P<0.05$). **Conclusion:** miR-142 can negatively regulate the expression of HMGB1 by targeting, thereby inhibiting the viability, proliferation, migration and invasion of CC cells.

Key words: miR-142; High mobility group protein 1; Cervical cancer; Cell biology

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)18-3406-07

前言

CC 是全世界女性第三大常见肿瘤, 每年新增病例大约为 52.98 万, 死亡病例大约为 27.51 万^[1]。近年来, 随着 CC 筛查的普及、人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)疫苗接种计划的实施以及对宫颈高级别上皮病变的积极干预和治疗, 使得 CC 发病率逐步降低, 但仍有一部分国家和地区 CC 发生率居高不下^[2]。在我国 CC 发病率和死亡率呈现显著上升趋势, 尤其是在年轻女性中, CC 已成为我国 15~44 岁女性第二常见的肿瘤和第三大肿瘤死亡原因, 严重威胁着广大女性生命安全, 其中 HrHPV 持续感染可能是导致 CC 发生的最主要原因^[3,4]。HrHPV 感染可导致宿主基因组改变, 一方面导致各种抑癌因子沉默, 另一方面导致各种促癌因子功能异常, 最终推动 CC 发生、发展^[5]。microRNA 可促进或者抑制靶基因活性, 最终发挥调控靶基因细胞生物学过程的作用^[6]。临床研究^[7]显示, miR-142 可以调节骨肉瘤细胞 HMGB1 的表达, 来调节骨肉瘤细胞增殖和肿瘤进展。本研究通过实验探究 miR-142 靶向 HMGB1 对 CC 细胞生物学行为的影响及其潜在的作用机制, 旨在为 CC 分子靶向治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集 59 例 CC 癌组织标本, 作为 CC 组, 标本来源于 2015 年 12 月至 2019 年 12 月在医院进行 CC 手术的患者, 患者进入医院后均进行子宫广泛性切除术, 且术后病理组织学活检确诊为 CC, 患者术前均未接受放、化疗。同时, 收集 59 例宫颈正常组织标本, 作为正常组, 标本来源于医院同时期的慢性宫颈炎患者宫颈正常组织。所有组织标本使用均经医院伦理委员会批准, 入组研究对象均提供书面知情同意书。

1.2 细胞系、试剂和仪器

CC 细胞 HeLa(人乳头瘤病毒 18 型阳性)和 SiHa(人乳头瘤病毒 16 型阳性)细胞购自上海拜力生物科技有限公司; RPMI-1640 培养基、10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素以及胰蛋白酶购自美国 hycione 公司; 同源重组法构建质粒试剂盒、CCK-8 试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司; Transwell 小室、BD Matrigel 基底膜基质胶购自上海研卉生物科技有限公司; Trizol 裂解液购买自广州东盛生物科技有限公司; HiScript® II One Step RT-PCR Kit (Dye Plus)试剂盒、AceQ® Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒购买自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 引物由上海生工生物公司提供; ECL 化学发光试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司; 鼠抗人 miR-142、HMGB1 单克隆抗体购自 Abcam 公司; 二抗购自 Cell signaling 公司; 7500 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; Tanon-1600 凝胶图象处理系统购自上海天能科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 宫颈癌组织 miR-142 和 HMGB1 表达检测 采用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 和蛋白质免疫印迹法 (Western Blot) 检测宫颈癌组织和正常组标本中 miR-142 和 HMGB1 表达水平。RT-PCR 检测: 向收集标本中加入 Trizol 试剂, 提取总 RNA, 利用 HiScript® II One Step RT-PCR Kit (Dye Plus) 试剂盒合成 cDNA, 以所得 cDNA 为模板, 按照 AceQ® Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行 PCR 扩增, 扩增仪器为 7500 qPCR 仪。以 U6 为内参基因, 引物序列为: Forward: 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3', Reverse: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3', 目的基因 miR-142 引物序列为: Forward: 5'-CGCCGTGTAGTGTTCCTAC-3', Reverse: 5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3', 目的基因 HMGB1 引物序列为: Forward: 5'-AATAGGAAAAGGATATTGCT-3', Reverse: 5'-GCGCTAGAACCAACTTATGA-3'。

Western Blot 检测: (1) 总蛋白提取: 收集细胞, 加入 1 mL 细胞裂解液, 并吹打混匀; 4℃ 摇床裂解 20 min, 再于 4℃ 12000 rpm 条件离心 10 min, 得到上清即为全蛋白提取物; 取所得上清, 95℃ 水浴 5 min, 保存备用; (2) 总蛋白浓度检测: 按照 BCA 试剂盒步骤检测并绘制标准曲线, 计算每个标本对应蛋白浓度; (3) SDS-PAGE 电泳: 制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶, 每孔加入 10 μL 处理好的蛋白样品, 并于 80V、120V 条件下进行电泳; (4) 转膜: 将分离胶转移至硝酸纤维素膜上, 150V 恒压 1.5~2 小时; (5) 免疫反应: 将硝酸纤维素膜浸入到 5% 脱脂奶粉 TBST 封闭液中, 并置于摇床孵育 1 小时; 再向封闭好的膜中加入一抗稀释液 (抗体稀释倍数 1:5000) 和 U6 (1:10000), 4℃ 孵育过夜, TBST 封闭液清洗 5 min, 重复三次, 再向膜中加入二抗稀释液 (稀释倍数 1:5000), 37℃ 孵育 1 小时, TBST 封闭液清洗 5 min, 重复三次; (6) ECL 显色: 严格按照 ECL 化学发光试剂盒操作; (7) 图像分析: 使用凝胶图象处理系统扫描图片, 并使用 Gel-PRO Analyzer 软件进行蛋白定量分析。

1.3.2 细胞培养 将宫颈癌细胞 HeLa 和 SiHa 细胞接种于含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 培养箱培养条件为: 37℃, 5% CO₂, 当细胞生长至 80%~90% 密度时进行传代培养, 将细胞浓度调整为 1×10^6 , 并接种于 10 cm 细胞培养皿中。

1.3.3 miR-142 和 HMGB1 靶向关系验证 通过 TargetScan、miRDB、miRanda 三个生物学靶标预测网站分析 miR-142 的可能靶基因, miR-142 的可能结合位点为 HMGB1 mRNA 的 3'UTR 位点 132~157, 利用荧光素酶报告实验来验证 miR-142 和 HMGB1 的靶向关系, 体外构建含有 miR-142 结合序列 HMGB1 基因 3'UTR 位点野生型 (HMGB1-WT) DNA 片段以及其突变体 (HMGB1-MUT) DNA 片段的载体, 并将其插入到双荧光素酶启动子载体中, 然后将构建好的 HMGB1-WT、HMGB1-MUT 分别与 miR-142 模拟物 (mimic) 和 miR-142 抑

性对照 (miR-142 negative control, miR-142 NC) 共转染到 CC 细胞 HeLa 和 SiHa 中, 分别记为 miR-142 mimic+HMGB1-WT、miR-142 mimic+HMGB1-MUT、miR-142 NC+HMGB1-WT、miR-142 NC+HMGB1-MUT 四组, 培养 48 h, 收集细胞, 并使用荧光素酶报告检测试剂盒测定各组细胞中荧光素酶活性。

1.3.4 细胞分组与转染 收集对数生长期的细胞, 并接种于 6 孔培养板中, 细胞浓度调整为 2×10^5 , 当细胞生长状态良好且达到 70%~80% 密度时进行转染, 将细胞分为 miR-142 mimic 组 (转染 miR-142 mimic)、miR-142 inhibitor 组 (转染 miR-142 inhibitor) 和 miR-NC 组 (转染空 mimic) 以及 miR-142 mimic+plasmid 组 (共转染 miR-142 mimic 和 HMGB1 过表达质粒)、miR-142 mimic+control plasmid 组 (共转染 miR-142 mimic 和空 plasmid) 和 miR-NC+plasmid 组 (转染空 mimic 和空 plasmid), 将带有目的基因的质粒和 Lipofectamine 2000 混合均匀, 并在室温放置 5 min 后加入 6 孔培养板中, 轻轻混匀, 置于培养箱转染 6 h, 并且在荧光显微镜下进行观察, 记录结果。采用 Western Blot 法测定 HMGB1 过表达 CC 细胞中各组 HMGB1 表达水平。

1.3.5 CCK-8 法检测细胞生存能力 将转染 48 小时、生长状态良好的细胞消化下来, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μ L, 细胞浓度调整为 5×10^4 ; 大约 4 小时, 待细胞完全贴壁以后, 弃掉培养基, 每孔加入 10 μ L 由无血清培养基和 CCK-8 原液以 10:1 比例配制的试剂, 放置于培养箱培养 1.5 小时; 使用酶标仪测定 450 nm 波长位置吸光度值, 并且记录 0 小时时的读数; 然后再记录 24 小时、48 小时、72 小时以及 96 小时酶标仪测定 450 nm 处吸光度值 (A), 取三个复孔, 绘制细胞生长曲线。

1.3.6 克隆形成实验检测细胞增殖能力 转染完成以后, 使用胰酶消化各组细胞, 并将细胞吹打成单细胞悬液, 取 100 个细胞 / 孔接种于 6 孔培养板中, 加入 2 mL 培养基, 使得细胞均匀分布于培养板中; 置于培养箱培养 7 天, 观察到单个细胞生长成团状克隆时, 弃掉培养基, 使用 PBS 漂洗两次, 并在每孔加入 300 μ L 结晶紫染色液染色 20 min, 再使用自来水漂洗至无色, 晾干; 最后, 使用酶联斑点图像自动分析仪扫描、拍照, 计算克隆数量。

1.3.7 划痕修复实验检测细胞迁移能力 将转染 48 小时、生长状态良好的细胞消化下来, 取适量细胞接种于 6 孔培养板中, 使得细胞贴壁培养并单层生长至 80%~90%; 弃掉培养基, 使用 100 μ L 无菌移液枪头轻轻地单层细胞上垂直划一条直线, 更换无血清培养基, 拍照; 置于培养箱培养 48 小时, 再次拍照, 观察划痕处细胞生长情况, 并测量两次划痕宽度, 划痕愈合百分比 = 前后两次划痕宽度变化 / 各组初始划痕距离。

1.3.8 基质胶侵袭实验检测细胞侵袭能力 取膜孔径为 8 μ m 的 Transwell 小室悬挂于 24 孔培养板中, 实验前一天将 Transwell 小室底部用培养基稀释的 BD Matrigel 基底膜基质胶包被过夜, 以凝固基质胶, 次日水化 6 小时; 将转染 48 小时、生长状态良好的细胞消化下来, 使用无血清培养基调整细胞浓度为 5×10^5 / mL; 将 Transwell 小室置于 24 孔培养板中, 向上室内加入 100 μ L 稀释好的单细胞悬液, 向下室内加入 500 μ L 含 10% 的胎牛血清, 置于培养箱培养 24 小时; 将 Transwell 小室取出, 使用 4% 的多聚甲醛固定 20 min, 再使用 0.1% 的结晶紫染色液

染色 30 min, 显微镜下观察膜下室面表面细胞, 拍照并且选取 5 个视野计数, 取平均值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件对所得结果进行分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, 对计量资料行正态性检验和方差齐性检验, 两组间差异性对比采用独立样本 t 检验, 多组间差异性对比采用单因素方差检验, 差异性均以 $P < 0.05$ 表示存在统计学意义。

2 结果

2.1 CC 癌组织中 miR-142 和 HMGB1 表达水平的相关性

CC 组 miR-142 mRNA 和蛋白表达水平显著低于正常组 ($P < 0.05$) (图 1A 和 C), HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平显著高于正常组 ($P < 0.05$) (图 1B 和 D)。

Pearson 分析结果显示, CC 癌组织中 miR-142 和 HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平均呈显著负相关 ($r = -0.399, P = 0.002$; $r = -0.429, P = 0.001$) (图 2A 和 B)。实验结果表明, CC 癌组织中 miR-142 和 HMGB1 表达水平呈显著负相关关系。

2.2 miR-142 对 HMGB1 的靶向调控作用

通过 TargetScan、miRDB、miRanda 三个生物学靶标预测网站分析 miR-142 的可能靶基因, 结果显示, HMGB1 mRNA 3'-UTR 区域含有可与 miR-142 互补的结合序列, 且序列位于 HMGB1 mRNA 3'-UTR 区域 132 到 157 位核苷酸 (图 3A)。构建 HMGB1 mRNA 上结合位点 HMGB1-WT 和 HMGB1-MUT 报告载体并与 miR-142 mimic 和 miR-142 NC 共转染, 荧光素酶报告实验结果显示, CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞中, 与 miR-142 NC+HMGB1-WT 组比较, miR-142 mimic+HMGB1-WT 组荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$), miR-142 NC+HMGB1-MUT 组和 miR-142 mimic+HMGB1-MUT 组比较无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 3B)。

2.3 miR-142 可抑制 CC 细胞生存、增殖、迁移和侵袭能力

CCK-8 法实验结果显示, CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞中, miR-142 mimic 组细胞生存能力显著低于 miR-NC 组 ($P < 0.05$), miR-142 inhibitor 组细胞生存能力显著高于 miR-NC 组 (图 4A 和 B)。克隆形成实验结果显示, CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞中, miR-142 mimic 组细胞增殖能力显著低于 miR-NC 组 ($P < 0.05$), miR-142 inhibitor 组细胞增殖能力显著高于 miR-NC 组 (图 4C 和 D)。划痕修复实验结果显示, CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞中, miR-142 mimic 组细胞迁移能力显著低于 miR-NC 组 ($P < 0.05$), miR-142 inhibitor 组细胞迁移能力显著高于 miR-NC 组 (图 4E 和 F)。基质胶侵袭实验结果显示, CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞中, miR-142 mimic 组细胞侵袭能力显著低于 miR-NC 组 ($P < 0.05$), miR-142 inhibitor 组细胞侵袭能力显著高于 miR-NC 组 (图 4G 和 H)。

2.4 过表达 HMGB1 对 CC 细胞生存、增殖、迁移和侵袭能力的影响

Western Blot 实验结果显示, HMGB1 过表达 CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞中, miR-142 mimic+plasmid 组 HMGB1 蛋白表达水平显著高于 miR-142 mimic+control plasmid 组 ($P < 0.05$), 显著低于 miR-NC+plasmid 组 ($P < 0.05$) (图 5A 和 B)。

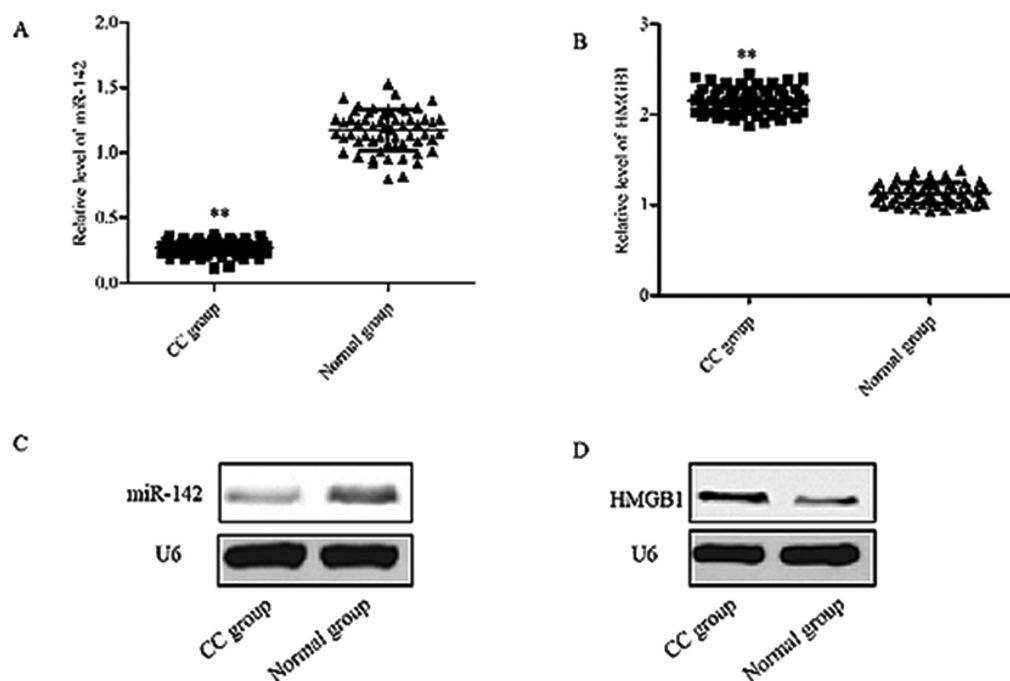


图1 CC 癌组织和正常组织中 miR-142 和 HMGB1 的表达

(注:A 为 CC 癌组织和正常组织中 miR-142 mRNA 表达;B 为 CC 癌组织和正常组织中 HMGB1 mRNA 表达;C 为 CC 癌组织和正常组织中 miR-142 蛋白表达;D 为 CC 癌组织和正常组织中 HMGB1 蛋白表达;与正常组相比, ** $P<0.01$ 。

Fig.1 The expression of miR-142 and HMGB1 in CC cancer tissues and normal tissues

(Note: A is the expression of miR-142 mRNA in CC cancer tissues and normal tissues; B is the expression of HMGB1 mRNA in CC cancer tissues and normal tissues; C is the expression of miR-142 protein in CC cancer tissues and normal tissues; D is the expression of HMGB1 protein in CC cancer tissues and normal tissues; Compared with the normal group, ** $P<0.01$.)

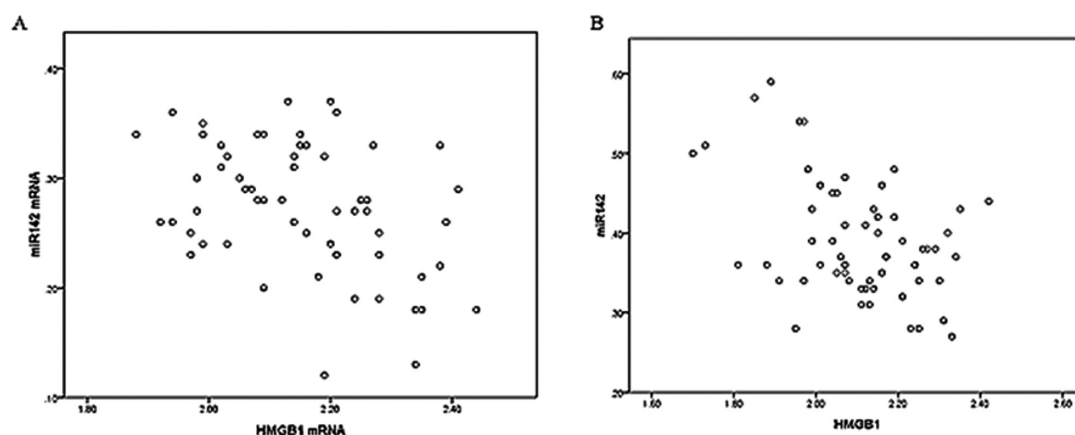


图2 CC 癌组织中 miR-142 和 HMGB1 表达水平的相关性

注:A 为 CC 癌组织中 miR-142 和 HMGB1 mRNA 表达的相关性;B 为 CC 癌组织中 miR-142 和 HMGB1 蛋白表达的相关性。

Fig.2 Correlation between the expression levels of miR-142 and HMGB1 in CC cancer tissues

Note: A is the correlation between miR-142 and HMGB1 mRNA expression in CC cancer tissue; B is the correlation between miR-142 and HMGB1 protein expression in CC cancer tissue.

CCK-8 法实验、克隆形成实验、划痕修复实验和基质胶侵袭实验结果显示, HMGB1 过表达 CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞中, miR-142 mimic+plasmid 组细胞生存、增殖、迁移和侵袭能力显著高于 miR-142 mimic+control plasmid 组 ($P<0.05$), 显著低于 miR-NC+plasmid 组 ($P<0.05$) (图 6A~H)。

3 讨论

miRNA 一类长度大约为 19~25 个核苷酸的内源性单链非编码 RNA, 近年来有许多研究证实, miRNA 与多种恶性肿瘤显著相关, 并可能成为新的治疗靶点^[8-10]。报道^[11]亦显示, CC 的

发生发展也与 miRNA 异常表达存在紧密联系。miR-142 作为 miRNA 家族中重要的一员, 在 CC 中发挥着重要的抑癌基因作用, 但其详细作用机制并未明确^[12]。

研究^[13]显示, HMGB1 是 miR-142 的潜在靶基因, 与多种恶性肿瘤的发生、发展存在紧密联系。Xiao 等^[14]报道表明, miR-142-3p 可能通过下调 HMGB1 在非小细胞肺癌中发挥抑癌作用, 有可能成为非小细胞肺癌的抑癌剂和潜在治疗药物。Fu 等^[15]研究也显示, miR-142-3p 通过直接结合 HMGB1 的 3'-UTR 来抑制 HMGB1 基因的转录, 进而抑制肝癌细胞侵袭和迁移, 可能是肝癌患者潜在的诊断和治疗生物标志物。本研

究中,与正常组织相比,CC 癌组织中 miR-142 表达显著下调, HMGB1 表达显著上调,且 CC 癌组织中 miR-142 和 HMGB1 表达水平呈显著负相关关系,表明 miR-142 低表达在 CC 中发

挥作用,并可能是通过上调 HMGB1 表达来实现的,与上述研究结果一致。

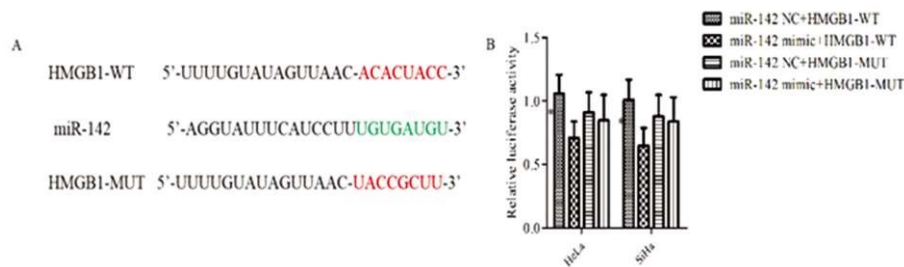


图3 验证 miR-142 与 HMGB1 的靶向关系

注:A 为软件分析 miR-142 与 HMGB1 的结合位点;B 为荧光素酶报告实验分析 miR-142 与 HMGB1 靶向关系;与 miR-142 NC+HMGB1-WT 组相比,* $P<0.05$ 。

Fig.3 Verification of the targeting relationship between miR-142 and HMGB1

Note: A is the software to analyze the binding site of miR-142 and HMGB1; B is the luciferase report experiment to analyze the targeting relationship between miR-142 and HMGB1; Compared with miR-142 NC+HMGB1-WT group, * $P<0.05$.

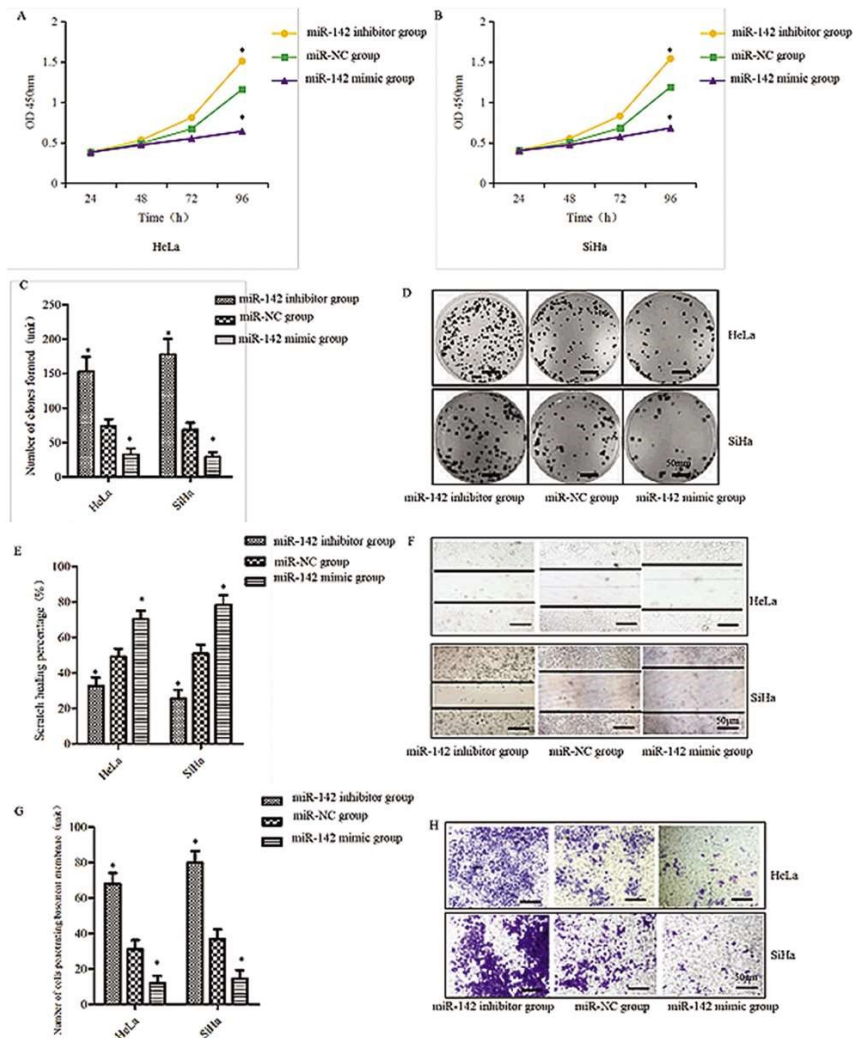


图4 CC 细胞生存、增殖、迁移和侵袭能力的变化

注:A 和 B 为 CCK-8 法检测 CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞各组生存能力;C 和 D 为克隆形成实验检测 CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞各组克隆形成数;E 和 F 为划痕修复实验检测 CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞各组划痕愈合百分比;G 和 H 为基质胶侵袭实验检测 CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞各组穿透基底膜细胞数;与 miR-NC 组相比,* $P<0.05$ 。

Fig.4 Changes in CC cell survival, proliferation, migration and invasion ability

Note: A and B are the CCK-8 method to detect the viability of each group of CC cells HeLa and SiHa cells; C and D are clone formation experiments to detect the number of clone formation in each group of CC cells HeLa and SiHa cells; E and F are the scratch repair experiments to detect the percentage of scratch healing in each group of CC cells HeLa and SiHa cells; G and H are Matrigel invasion experiments to detect the number of cells that penetrated the basement membrane in each group of CC cells HeLa and SiHa cells; compared with the miR-NC group, * $P<0.05$.

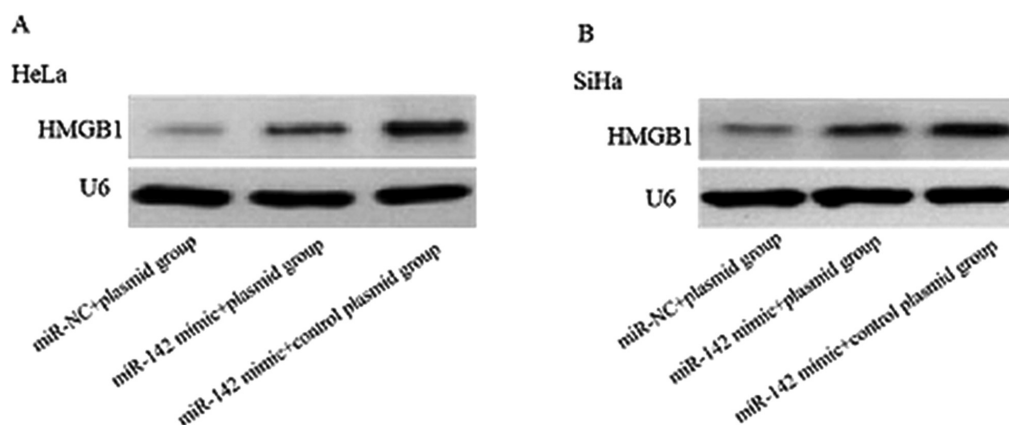


图5 HMGB1 过表达 CC 细胞中 HMGB1 蛋白表达水平

Fig.5 HMGB1 protein expression level in CC cells overexpressing HMGB1

本研究亦通过在线软件预测以及荧光素酶报告实验分析均显示,miR-142 与 HMGB1 的 3'-UTR 直接结合,并对 HMGB1 发挥负调控作用, HMGB1 可能是 miR-142 的靶向基因。因此,miR-142 可能是通过靶向调控 HMGB1 在 CC 中发挥作用,为进一步研究 miR-142 与 HMGB1 的关系以及 miR-142 在 CC 中的作用提供了基础根据。据此,本研究通过体外实验发现,miR-142 表达上调可抑制 CC 细胞生存、增殖、迁移和侵袭,miR-142 表达下调则可促进 CC 细胞生存、增殖、迁移和侵袭,表明 miR-142 基因表达改变可能与 CC 恶性生物学行为有关,有可能是 CC 诊断和治疗的一个靶点指标。既往研究^[16]也表明,miR-142 在 CC 组织中显著下调,其低表达与 CC 患者淋巴结转移、宫颈浸润深度和低生存率有关。此外,miR-142 对 CC 细胞具有抑制增殖、侵袭作用,二甲双胍可增加 miR-142 丰度,进而抑制 CC 细胞迁移、侵袭^[17]。本研究结果与之一致,进一步支持了 miR-142 是 CC 的一个抑癌基因。miRNA 可与 mRNA 的 3'-UTR 结合,进而导致蛋白质编码基因表达下调和功能退化^[18]。HMGB1 是 HMGB 家族成员之一,也属于一种高度保守的 DNA 结合蛋白,在包括 CC 在内的多种肿瘤中高表达,并促进肿瘤发生、发展^[19]。本研究前期工作也已证实 HMGB1 是 miR-142 的靶点基因,miR-142 有可能通过下调 HMGB1 表达来抑制 CC 恶性细胞生物学行为。本研究通过共转染 miR-142 mimics 和 HMGB1 过表达质粒,结果表明, HMGB1 过表达可降低 miR-142 抑制 CC 细胞生存、增殖、迁移和侵袭能力,提示 miR-142 是通过靶向抑制 HMGB1 表达,进而增强对 CC 细胞生存、增殖、迁移和侵袭的抑制。Jiang 等^[20]研究也表明, HMGB1 过表达可减轻 miR-142 对 CC 细胞的增殖、侵袭抑制作用,并促进细胞凋亡,为 CC 治疗奠定了新的基础。因此,miR-142 对 CC 细胞生存、增殖、迁移和侵袭的抑制作用可被 HMGB1 过表达所阻断,初步揭示了 miR-142 抑制 CC 的潜在分子机制。但仍需要进一步研究 miR-142 在体内模型中的临床应用价值,以深入阐明其靶向调控 HMGB1 的作用机制,以及开展更多研究以探讨 miR-142/HMGB1 信号通路在 CC 发生、发展中的分子机理。

综上所述,miR-142 可通过靶向调控 HMGB1 表达,进而抑制 CC 细胞增殖、迁移和侵袭,miR-142/HMGB1 信号通路可能是 CC 治疗的潜在靶点,也进一步揭示了 CC 发病的分子遗传机制,有望作为 CC 患者预后的生物标志物和治疗靶点,具有临床借鉴价值。

参考文献 (References)

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386
- [2] 夏丹丹, 席晓薇. IL-15 联合 HPV 基因疫苗治疗宫颈癌的前景[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(3): 436-441
- [3] Masayoshi H, Hiromasa F, Sharon JBH, et al. Incidence risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 or more severe lesions is a function of human papillomavirus genotypes and severity of cytologic and histological abnormalities in adult Japanese women [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(2): 327-334
- [4] 何海, 徐建平, 刘健玲, 等. 宫颈病变中心体异常扩增与高危人乳头状瘤病毒感染相关性 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2015, 29 (3): 247-249
- [5] Bogani G, Leone RMU, Signorelli M, et al. The role of human papillomavirus vaccines in cervical cancer: pre-vention and treatment [J]. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 2018, 122: 92-97
- [6] Li P, Xu M, Cai H, et al. The effect of HMGB1 on the clinicopathological and prognostic features of cervical cancer [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(5): BSR20181016
- [7] Rapoport BL, Steel HC, Theron AJ, et al. High Mobility Group Box 1 in Human Cancer[J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1664
- [8] Paronetto MP, Passacantilli I, Sette C. Alternative splicing and cell survival: from tissue homeostasis to disease [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23: 1919-29
- [9] Schumann U, Shafik A, Preiss T. METTL3 gains R/W access to the Epitranscriptome[J]. *Mol Cell*, 2016, 62(3): 323-324
- [10] Meyer KD, Jaffrey SR. Rethinking m(6)a readers, writers, and erasers [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017, 33: 319-42
- [11] Wang Q, Qin J, Chen A, et al. Downregulation of microRNA-145 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer [J]. *Tumor Biol* 36: 3703-3708, 2015. 10. Fang H, Shuang D, Yi Z, S
- [12] Yi Y, Liu Y, Wu W, et al. Reconstruction and analysis of circRNA miRNA mRNA network in the pathology of cervical cancer[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(4): 2209-2225
- [13] Dong H, Song J. miR-142-3p reduces the viability of human cervical cancer cells by negatively regulating the cytoplasmic localization of HMGB1[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(3): 212
- [14] Xiao P, Liu WL. MiR-142-3p functions as a potential tumor suppressor directly targeting HMGB1 in non-small-cell lung carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 10800-10807

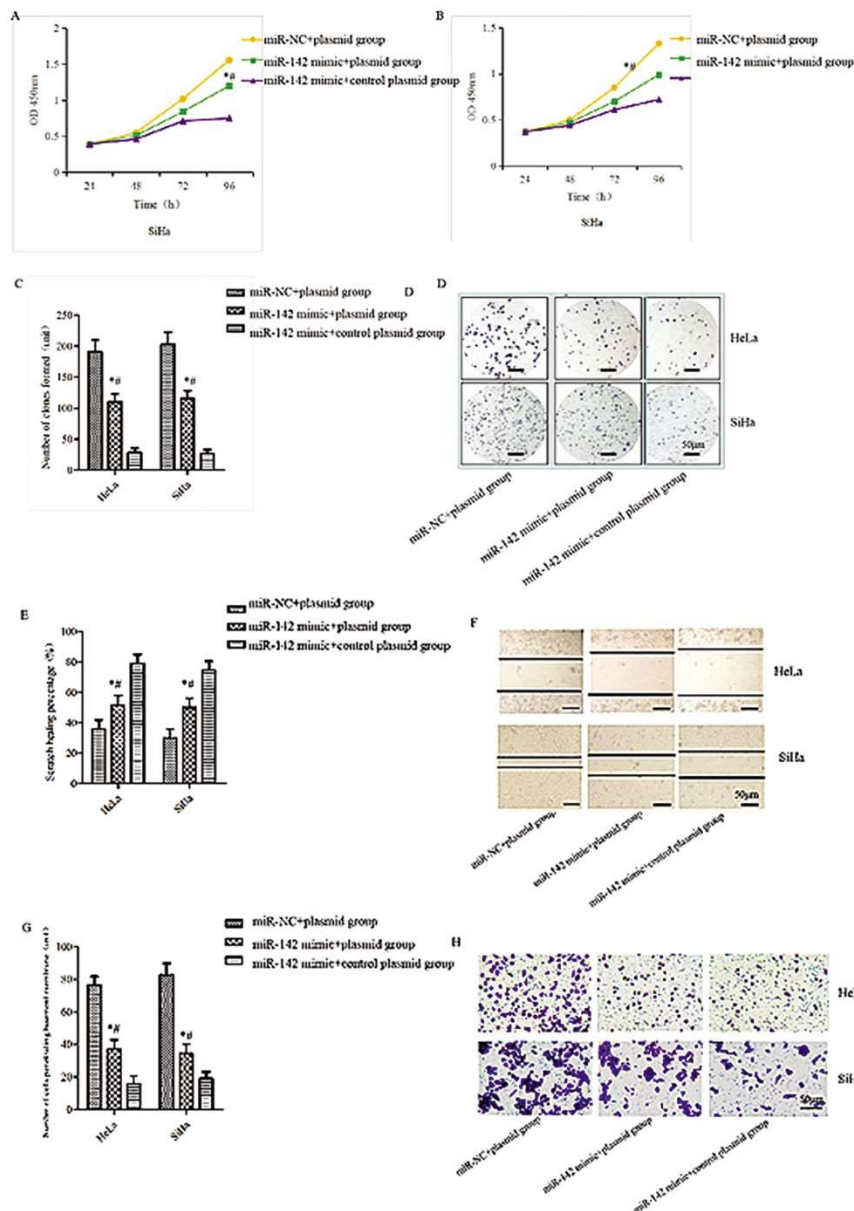


图 6 HMGB1 过表达 CC 细胞生存、增殖、迁移和侵袭能力的变化

注: A 和 B 为 CCK-8 法检测 HMGB1 过表达 CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞各组生存能力; C 和 D 为克隆形成实验检测 HMGB1 过表达 CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞各组克隆形成数; E 和 F 为划痕修复实验检测 HMGB1 过表达 CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞各组划痕愈合百分比; G 和 H 为基质胶侵袭实验检测 HMGB1 过表达 CC 细胞 HeLa 和 SiHa 细胞各组穿透基底膜细胞数; 与 miR-142 mimic+control plasmid 组相比, $*P<0.05$; 与 miR-NC+plasmid 组相比, $^{\#}P<0.05$ 。

Fig.6 Changes in survival, proliferation, migration and invasion of CC cells overexpressing HMGB1

Note: A and B are the CCK-8 method to detect the viability of each group of HMGB1 overexpressing CC cells HeLa and SiHa cells; C and D are the number of clone formation in each group of HeLa and SiHa cells detected by HMGB1 overexpressing CC cells in the colony formation experiment; E and F are the scratch repair test to detect the percentage of scratch healing in each group of HMGB1 overexpressing CC cells HeLa and SiHa cells; G and H are Matrigel invasion experiments to detect the number of cells that penetrate the basement membrane in each group of HMGB1 overexpressing CC cells, HeLa and SiHa cells; Compared with miR-142 mimic+control plasmid group, $*P<0.05$; compared with miR-NC+plasmid group, $^{\#}P<0.05$.

- [15] Fu Y, Sun LQ, Huang Y, et al. miR-142-3p Inhibits the Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cells by Regulating HMGB1 Gene Expression[J]. Curr Mol Med, 2018, 18(3): 135-141
- [16] Li M, Li B Y, Xia H, et al. Expression of microRNA-142-3p in cervical cancer and its correlation with prognosis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(10): 2346-2350
- [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: 59-67
- [18] Li A, Zhang J, Zhou Z, et al. Genome-scale identification of miRNA-mRNA and miRNA-lncRNA interactions in domestic animals[J]. Anim Genet, 2015, 46(6): 716-719
- [19] Li P, Xu M, Cai H, et al. The effect of HMGB1 on the clinicopathological and prognostic features of cervical cancer [J]. Biosci Rep, 2019, 39(5): BSR20181016
- [20] Jiang D, Wang H, Li Z, et al. MiR-142 inhibits the development of cervical cancer by targeting HMGB1 [J]. Oncotarget, 2017, 8(3): 4001-4007