

生殖系疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002399

hsa-miR-214-5p 通过下调 PAK4 对子宫颈癌 HeLa 细胞活力和凋亡的调控作用

瞿小玲¹, 曾 仪², 姚 利¹, 蔡 政³

(1. 南阳市中心医院产二科, 南阳 473000; 2. 郑州大学基础医学部, 郑州 450000;

3. 云南省中医医院肿瘤科, 昆明 650021)

【摘要】目的:探究微小 RNA-214-5p (micro RNA-214-5p, miR-214-5p) 对宫颈癌 HeLa 细胞生长和凋亡的作用及机制。**方法:**将细胞分为 HeLa 组、mimic-scramble 组、miR-214 mimic 组和 miR-214 inhibitor 组, 用 miR-214 mimic 和 miR-214 inhibitor 转染细胞, qRT-PCR 检测 miR-214 和 p21 活化激酶 4 (P21-activated kinases 4, PAK4) 的表达; 生物信息学方法预测 miR-214-5p 与 PAK4 的关系, 荧光素酶报告实验验证 miR-214-5p 与 PAK4 的关系; 用 pcDNA-PAK4 (pc-PAK4)、miR-214 mimic 和 miR-214 inhibitor 转染细胞, Western blot 检测 PAK4 的表达; CCK-8 检测细胞活力; 流式细胞术检测细胞凋亡。**结果:**miR-214 mimic 组 miR-214-5p mRNA 的表达水平 (46.02 ± 5.23) 较 HeLa 组 (1.00 ± 0.01) 明显升高 ($LSD-t=31.423, P=0.000$), miR-214 mimic 组 PAK4 蛋白的表达水平 (0.08 ± 0.04) 较 HeLa 组 (0.26 ± 0.05) 明显降低 ($LSD-t=4.296, P=0.002$); miR-214 inhibitor 组 miR-214-5p mRNA 的表达水平 (0.41 ± 0.05) 较 HeLa 组 (1.00 ± 0.01) 明显降低 ($LSD-t=18.726, P=0.000$), miR-214 inhibitor 组 PAK4 蛋白的表达水平 (0.58 ± 0.05) 较 HeLa 组 (0.26 ± 0.05) 明显升高 ($LSD-t=5.061, P=0.001$); miR-214-5p 与 PAK4 可靶向结合。miR-214 mimic 组细胞生长速度 (3.50 ± 0.45) 较 HeLa 组 (5.02 ± 0.35) 明显降低 ($t_0=8.644, P=0.000$), miR-214 mimic 组细胞凋亡率 [$(11.42 \pm 0.71)\%$] 较 HeLa 组 [$(2.61 \pm 0.63)\%$] 明显升高 ($LSD-t=4.032, P=0.003$); miR-214 inhibitor 组细胞生长速度 (5.89 ± 0.32) 较 HeLa 组 (5.02 ± 0.35) 明显升高 ($LSD-t=7.863, P=0.000$), miR-214 inhibitor 组细胞凋亡率 [$(0.53 \pm 0.42)\%$] 较 HeLa 组 [$(2.61 \pm 0.63)\%$] 明显降低 ($LSD-t=4.221, P=0.002$); 共转染 pc-PAK4 能逆转 miR-214 mimic 对细胞活力和细胞凋亡的调控作用。**结论:**miR-214-5p 能通过靶向下调 PAK4 抑制宫颈癌 HeLa 细胞活力并诱导细胞凋亡。

【关键词】宫颈癌; miR-214-5p; PAK4; 细胞活力; 细胞凋亡**【中图分类号】**R737.33**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-07-16

Regulatory role of hsa-miR-214-5p on HeLa cells' viability and apoptosis by down-regulating PAK4

Qu Xiaoling¹, Zeng Yi², Yao Li¹, Cai Zheng³

(1. Second Department of Obstetrics, Nanyang Central Hospital; 2. Department of Basic Medicine, Zhengzhou University; 3. Department of Oncology, Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】Objective: To investigate the role of micro-RNA-214-5p (miR-214-5p) on the HeLa cells' cell viability and apoptosis and its mechanism. **Methods:** HeLa cells were divided into the HeLa group, the mimic-scramble group, the miR-214 mimic group and the miR-214 inhibitor group. The miR-214 mimic and miR-214 inhibitor were used to transfect cells, the qRT-PCR was used to measure expression levels of miR-214 and P21-activated kinases 4 (PAK4), the bioinformatic approach was used to predict the relationship of miR-214-5p and PAK4, and the luciferase reporter assay was used to determine their relationship. The pcDNA-PAK4 (pc-PAK4), miR-214 mimic and miR-214 inhibitor were used to transfect HeLa cells, the Western blot was used to determine protein level of PAK4, the CCK-8 assay was used to measure cell viability and the flow cytometry was performed to detect apoptosis. **Results:** The expression level of miR-214-5p in the miR-214 mimic group (46.02 ± 5.23) was significantly higher than that in the HeLa group (1.00 ± 0.01) ($LSD-t=31.423, P=0.000$). The expression level of PAK4 in the miR-214 mimic group (0.08 ± 0.04) was

significantly lower than that in the HeLa group (0.26 ± 0.05) ($LSD-t=4.296, P=0.002$). The expression level of miR-214-5p in the miR-214 inhibitor group (0.41 ± 0.05) was significantly lower than that in the HeLa group (1.00 ± 0.01) ($LSD-t=18.726, P=0.000$). The expression level of PAK4 in the miR-214 inhibitor group (0.58 ± 0.05) was significantly higher than

作者介绍: 瞿小玲, Email: 378641296@qq.com,

研究方向: 产科方向的研究。

通信作者: 蔡 政, Email: caizheng999@126.com。

基金项目: 河南省科技发展基金资助项目 (编号: 132102310388)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200324.1427.030.html>

(2020-03-25)

that in the HeLa group of (0.26 ± 0.05) ($LSD-t=5.061, P=0.001$). The miR-214-5p was able to be targeted-bound with PAK4. The cell growth rate in the miR-214 mimic group (3.50 ± 0.45) was significantly lower than that in the HeLa group (5.02 ± 0.35) ($LSD-t=8.644, P=0.000$). The apoptosis rate in the miR-214 mimic group $[(11.42 \pm 0.71)\%]$ was significantly higher than that in the HeLa group $[(2.61 \pm 0.63)\%]$ ($LSD-t=4.032, P=0.003$). The cell growth rate in the miR-214 inhibitor group (5.89 ± 0.32) was significantly higher than that in the HeLa group (5.02 ± 0.35) ($LSD-t=7.863, P=0.000$). The apoptosis rate in the miR-214 inhibitor group $[(0.53 \pm 0.42)\%]$ was significantly lower than that in the HeLa group $[(2.61 \pm 0.63)\%]$ ($LSD-t=4.221, P=0.002$). Co-transfection of pc-PAK4 was able to reverse the regulation function of miR-214 mimic on cell viability and apoptosis. **Conclusion:** The miR-214-5p inhibits the viability of HeLa cells and induces their apoptosis by down-regulating PAK4.

[Key words] cervical cancer; micro-RNA-214-5p(miR-214-5p); pcDNA-PAK4(PAK4); cell viability; apoptosis

宫颈癌是常见的女性生殖系统癌症,是导致女性癌症死亡的主要原因^[1]。据统计,宫颈癌每年的新发病例高达 530 000 人,其中 84% 出现在发展中国家^[2-3]。中国也是宫颈癌的高发地区。我国每年宫颈癌新发病例约占全球发病率的 38%^[4]。虽然目前对宫颈癌的诊断及治疗预防水平有所提高,但宫颈癌预后仍不理想。因此,寻找宫颈癌发病机制是降低宫颈癌发病率的关键。近年来的研究表明,微小RNA (microRNA, miRNA) 在宫颈癌细胞中表达异常,在癌症的发生发展过程中起到重要的调控作用^[5-6],如 miR-219a 和 miR-146a 在宫颈癌患者组织中表达异常升高^[7]。miR-196a 在宫颈癌中表达降低,上调 miR-196a 表达能抑制宫颈癌细胞的增殖^[8]。也有研究发现 miR-214 在宫颈癌细胞中表达水平降低,miR-214 能抑制宫颈癌细胞增殖和迁移,但具体作用机制还有待探讨^[9]。本研究以 HeLa 细胞为研究对象,探讨 miR-214-5p 对宫颈癌细胞生长及凋亡的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 试剂

RPMI 1640 培养液(货号 11875-039)、胎牛血清(货号 10099141)和胰酶(货号 25200114)均购自 Gibco 公司;RIPA 裂解液(货号 P0013B)、Trizol 试剂(货号 R0016)和 BCA 试剂盒(货号 P0012)购自碧云天生物科技公司;CCK-8 试剂盒(货号 69-21295)购自默沙克生物科技公司;细胞转染试剂盒、逆转录试剂盒和荧光定量试剂盒购自美国 ThermoFisher 公司;Dual-Luciferase[®] Report 试剂盒购自 Promega 公司;抗 P21 活化激酶 4(P21-activated kinases 4, PAK4, 货号 K2765)、抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(货号 SAB3701250)均购自美国 Sigma 公司;miR-214 mimic 购自美国 Invitrogen 公司;pcDNA-PAK4(pc-PAK4)由汉恒生物设计合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HeLa 细胞购自中国科学院细胞库。用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液将 HeLa 细胞培养于 37 ℃, 5%CO₂ 的恒温细胞培养箱中,细胞融合率达到 80%以上时进行传代培养。

1.2.2 细胞转染 将细胞以 1×10^5 个/mL 的密度传代培养于 12 孔板中,培养 24 h 后根据转染试剂盒说明书用 Lipofectamine 2000 将 miR-214 mimic 和 pc-PAK4 转染进 HeLa 细胞,转染 6 h 后将转染试剂更换为正常培养液继续培养 48 h 后进行检测。

1.2.3 qRT-PCR 实验 将细胞分为空白对照组、mimic-scramble 组和 miR-214 mimic 组,用 miR-214 mimic 对 miR-214 mimic 组细胞进行转染,mimic-scramble 组用载体处理,HeLa 组则加入正常培养液处理。细胞转染 48 h 后用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA,进行定量分析并调平后,用反转录试剂盒合成 cDNA,用 PCR 仪进行扩增后,根据荧光定量 PCR 试剂盒对 cDNA 进行定量分析。以 GAPDH 为内参,实验所用引物由上海生工设计合成。

1.2.4 荧光素酶报告实验 生物信息预测 PAK4 在 miR-214-5p 上的结合位点,PCR 扩增两者结合片段并将该片段插入荧光素酶载体中,构建 PAK4 野生质粒;再利用基因突变技术将结合位点的部分核苷酸突变,构建 PAK4 突变质粒。用 PAK4 野生质粒或 PAK4 突变质粒与 miR-214 mimic 共转染 HeLa 细胞,根据报告基因试剂盒说明书检测各组荧光素酶活性。

1.2.5 Western blot 实验 将细胞随机分为空白对照组、miR-214 mimic 组、pc-PAK4 组和 mimic + pc-PAK4 组,用 miR-214 mimic 和 pc-PAK4(野生型)转染细胞后,用 RIPA 裂解液于冰上提取各组细胞总蛋白,用 BCA 试剂盒对蛋白质进行定量分析并调平。各组取等量蛋白用 12% SDS-PAGE 进行分离,半干法将蛋白质转移至 PVDF 膜,用 5%脱脂牛奶对 PVDF 进行封闭,随后加入抗 PAK4 抗体(1:1 000)4 ℃孵育过夜。第 2 天弃 I 抗,加入 II 抗,室温孵育 1 h 后,滴加化学发光显色液于暗室进行曝光显影。

1.2.6 CCK-8 实验检测细胞活力 将细胞传代培养于 96 孔板中,细胞密度为 1×10^5 个/mL,用 miR-214 mimic 和 pc-PAK4

转染细胞后,将细胞分别连续培养 0、1、2、3 和 4 d,根据 CCK-8 试剂盒说明书每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂,继续培养 4 h 检测各组细胞活力。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 miR-214 mimic 和 pc-PAK4 转染细胞后,用胰蛋白酶收集细胞,用缓冲液清洗后重悬沉淀,加入预冷的 70% 乙醇室温固定细胞 1 h,随后加入 PI 和 annexin V 室温处理 15 min,用流式细胞术检测 HeLa 细胞的凋亡情况。

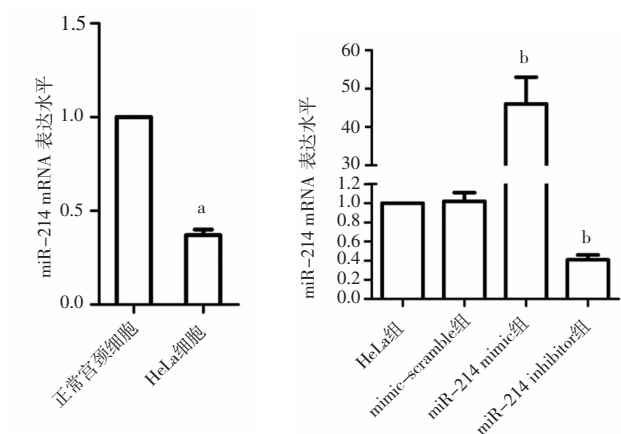
1.3 统计学处理

用统计作图软件 Graphpad prism 6.0 对所有实验数据进行统计学分析。实验数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。除细胞活力采用重复测量方差分析外,其余多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-214-5p 对 HeLa 细胞 PAK4 表达的影响

与正常宫颈细胞 miR-214 表达水平 (1.00 ± 0.02) 相比, HeLa 细胞 miR-214 表达水平 (0.37 ± 0.03) 明显降低 ($LSD-t=21.054, P=0.000$); HeLa 组、mimic-scramble 组、miR-214 mimic 组、miR-214 inhibitor 组 miR-214-5p mRNA 的表达水平分别为 1.00 ± 0.01 、 1.02 ± 0.09 、 46.02 ± 5.23 、 0.41 ± 0.05 , 各组间存在统计学差异 ($F=1172.352, P=0.000$)。mimic-scramble 组、miR-214 mimic 组、miR-214 inhibitor 组分别与 HeLa 组进行 LSD-*t* 检验发现,与 HeLa 组比较,miR-214 mimic 组 miR-214-5p 的表达水平无明显变化 ($LSD-t=0.329, P=0.997$), miR-214 mimic 组 miR-214-5p 的表达水平明显升高 ($LSD-t=31.423, P=0.000$), miR-214 inhibitor 组 miR-214-5p 的表达水平明显降低 ($LSD-t=18.726, P=0.000$), 表明转染成功。具体如图 1 所示。



注:a,与正常宫颈细胞相比, $P < 0.01$

注:b,与 HeLa 组相比, $P < 0.01$

A. qRT-PCR 检测正常宫颈细胞和 HeLa 细胞中 miR-214 mRNA 表达水平

B. qRT-PCR 检测正常宫颈细胞和 HeLa 细胞中 iR-214 mRNA 表达水平

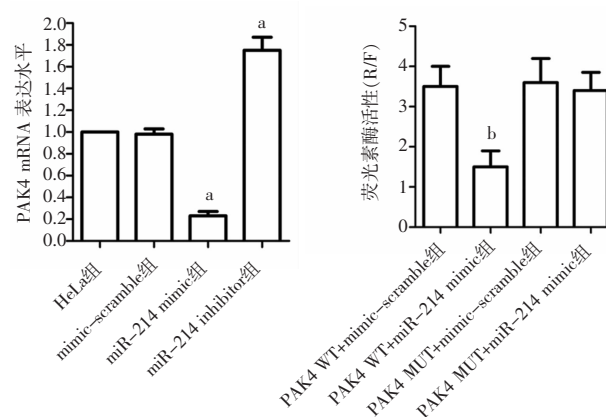
图 1 qRT-PCR 检测 miR-214 mRNA 表达水平

2.2 miR-214-5p 与 PAK4 的靶向关系

生物信息预测结果表明,miR-214-5p 序列上存在连续的 PAK4 结合位点(图 2A); HeLa 组、mimic-scramble 组、miR-214 mimic 组、miR-214 inhibitor 组 PAK4 mRNA 的表达水平分别为 1.01 ± 0.02 、 1.03 ± 0.05 、 0.23 ± 0.04 、 1.75 ± 0.12 , 组间存在统计学差异 ($F=547.245, P=0.000$, 图 2B)。mimic-scramble 组、miR-214 mimic 组、miR-214 inhibitor 组分别与 HeLa 组进行 LSD-*t* 检验发现,与 HeLa 组相比,mimic-scramble 组 PAK4 mRNA 的表达无明显变化 ($LSD-t=0.313, P=0.996$, 图 2B), miR-214 mimic 组细胞 PAK4 mRNA 的表达明显下调 ($LSD-t=26.228, P=0.000$, 图 2B), miR-214 inhibitor 组细胞 PAK4 mRNA 的表达明显上调 ($LSD-t=20.575, P=0.000$, 图 2B)。PAK4 WT+mimic-scramble 组、PAK4 WT+miR-214 mimic 组、PAK4 MUT+mimic-scramble 组、PAK4 MUT+miR-214 mimic 组荧光素酶活性分别是 3.51 ± 0.52 、 1.50 ± 0.43 、 3.62 ± 0.59 、 3.43 ± 0.45 , 组间具有统计学差异 ($F=16.882, P=0.003$)。PAK4 WT+mimic-scramble 组与 PAK4 WT+miR-214 mimic 组分别进行 LSD-*t* 检验发现,miR-214 mimic 能明显降低 PAK4 野生质粒的荧光素酶活性 ($LSD-t=5.184, P=0.001$, 图 2C), 结合位点突变后,miR-214 mimic 对荧光素酶活性的抑制作用消失。

hsa-miR-214-5p 3' CGUGUCGUUCACAUUCUGUCGU
|||||||
Position 239-245 of PAK4 3' UTR 5' ...ACCCCCACCCUCUGGACAGGCC...

A. 生物信息学软件预测 miR-214-5p 靶点



注:a,与 HeLa 组相比, $P < 0.01$

注:b,与 PAK4 WT+mimic-scramble 组相比, $P < 0.01$

B. qRT-PCR 检测 PAK4 mRNA 表达水平

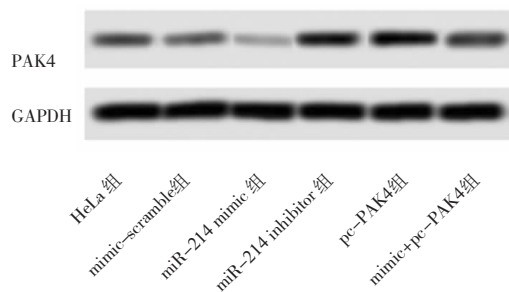
C. 报告基因试剂盒检测 荧光素酶活性

图 2 miR-214-5p 与 PAK4 的靶向关系

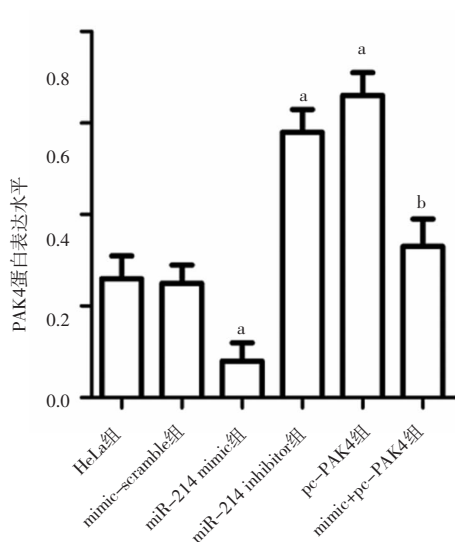
2.3 miR-214-5p 对 HeLa 细胞 PAK4 蛋白表达的影响

HeLa 组、mimic-scramble 组、miR-214 mimic 组、miR-214 inhibitor 组、pc-PAK4 组、mimic+pc-PAK4 组 PAK4 蛋白

表达水平分别是 0.26 ± 0.05 、 0.25 ± 0.04 、 0.08 ± 0.04 、 0.58 ± 0.05 、 0.66 ± 0.05 、 0.33 ± 0.06 ，组间存在统计学差异 ($F=118.324$, $P=0.000$)。mimic-scramble 组、miR-214 mimic 组、miR-214 inhibitor 组、pc-PAK4 组分别与 HeLa 组进行 LSD- t 检验发现，与 HeLa 组比较，mimic-scramble 组 PAK4 表达水平无明显变化 ($LSD-t=0.324$, $P=0.996$)，miR-214 mimic 组的 PAK4 表达水平明显降低 ($LSD-t=4.296$, $P=0.002$)，miR-214 inhibitor 组的 PAK4 表达水平明显升高 ($LSD-t=5.061$, $P=0.001$)，pc-PAK4 组的 PAK4 表达水平明显升高 ($LSD-t=5.243$, $P=0.000$)。mimic+pc-PAK4 组与 miR-214 mimic 组进行 LSD- t 检验发现，与 miR-214 mimic 组比较，mimic+pc-PAK4 组的 PAK4 蛋白表达水平明显升高 ($LSD-t=4.357$, $P=0.001$)。具体如图 3 所示。



A. 免疫蛋白印迹检测 PAK4 蛋白



注：a，与 HeLa 组相比， $P < 0.01$ ；b，与 miR-214 mimic 组相比

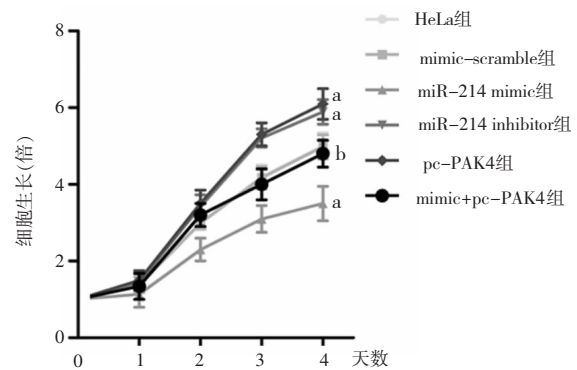
B. PAK4 蛋白相对表达水平统计

图 3 miR-214-5p 对 HeLa 细胞 PAK4 表达的影响

2.4 miR-214-5p 对 HeLa 细胞活力的影响

CKK-8 检测细胞生长速度结果显示，不同时间的细胞生长速度具有统计学差异 ($F=267.337$, $P=0.000$)，不同处理组间

也具有统计学差异 ($F=563.421$, $P=0.000$)，组间和时间点有交互作用 ($F=59.462$, $P=0.000$)。第 4 天时，HeLa 组、mimic-scramble 组、miR-214 mimic 组、miR-214 inhibitor 组、pc-PAK4 组、mimic + pc-PAK4 组细胞生长倍数分别是 5.02 ± 0.35 、 4.98 ± 0.31 、 3.50 ± 0.45 、 5.89 ± 0.32 、 6.10 ± 0.41 、 4.82 ± 0.36 ，各组间存在统计学差异 ($F=598.952$, $P=0.000$)。mimic-scramble 组、miR-214 mimic 组、miR-214 inhibitor 组、pc-PAK4 组分别与 HeLa 组进行 LSD- t 检验发现，与 HeLa 组比较，mimic-scramble 组细胞生长速度无明显变化 ($LSD-t=0.332$, $P=0.985$)，miR-214 mimic 组细胞生长速度明显降低 ($LSD-t=8.644$, $P=0.000$)，miR-214 inhibitor 组细胞生长速度明显升高 ($LSD-t=7.863$, $P=0.000$)，pc-PAK4 组细胞生长速度明显升高 ($LSD-t=8.031$, $P=0.985$)。mimic+pc-PAK4 组与 miR-214 mimic 组进行 LSD- t 检验发现，mimic+pc-PAK4 组的细胞生长速度明显高于 miR-214 mimic 组 ($LSD-t=8.694$, $P=0.000$)。具体如图 4 所示。

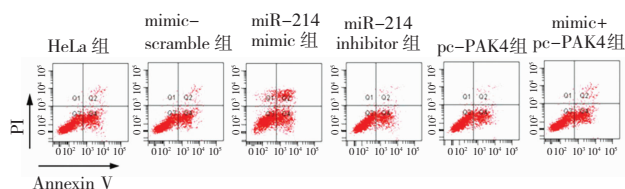


注：a，与 HeLa 组相比， $P < 0.01$ ；b，与 miR-214 mimic 相比， $P < 0.01$

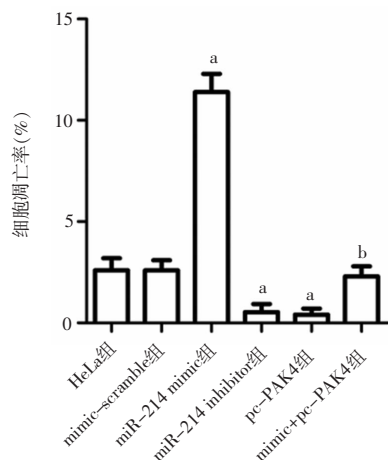
图 4 miR-214-5p 对 HeLa 细胞活性的影响

2.5 miR-214-5p 对细胞凋亡的影响

流式细胞术实验结果表明，HeLa 组、mimic-scramble 组、miR-214 mimic 组、miR-214 inhibitor 组、pc-PAK4 组、mimic + pc-PAK4 组细胞凋亡率分别是 $(2.61 \pm 0.63)\%$ 、 $(2.59 \pm 0.58)\%$ 、 $(11.42 \pm 0.71)\%$ 、 $(0.53 \pm 0.42)\%$ 、 $(0.43 \pm 0.27)\%$ 、 $(2.34 \pm 0.51)\%$ ，组间存在统计学差异 ($F=205.617$, $P=0.000$)。mimic-scramble 组、miR-214 mimic 组、miR-214 inhibitor 组、pc-PAK4 组分别与 HeLa 组进行 LSD- t 检验发现，与 HeLa 组比较，mimic-scramble 组细胞凋亡率无明显变化 ($LSD-t=0.338$, $P=0.992$)，miR-214 mimic 组细胞凋亡率明显升高 ($LSD-t=4.032$, $P=0.003$)，miR-214 inhibitor 组细胞的凋亡率明显降低 ($LSD-t=4.221$, $P=0.002$)，pc-PAK4 组细胞的凋亡率明显降低 ($LSD-t=4.183$, $P=0.02$)；mimic+pc-PAK4 组宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡率明显低于 miR-214 mimic 组 ($LSD-t=4.064$, $P=0.003$)。



A. 流式细胞术检测细胞凋亡情况



注:a,与 HeLa 组相比, $P<0.01$;b:与 miR-214 mimic 组和 pc-PAK4 组相比, $P<0.01$

B. 细胞凋亡率统计

图 5 miR-214-5p 对 HeLa 细胞凋亡的影响

3 讨论

研究表明,miRNAs 的异常表达是宫颈癌的发病机制之一,如 miRNA-338-3p 表达下调能促进宫颈癌细胞增殖,减少癌细胞凋亡^[10]。miRNA-101 在宫颈癌中的低表达水平与宫颈癌的转移及患者的预后密切相关^[11]。Yang 等^[12]研究发现,miR-214 在宫颈癌 HeLa 细胞中的表达异常减少,上调 miR-214 表达能抑制 HeLa 细胞的增殖及癌细胞集落的形成。miR-214-5p 抑制宫颈癌细胞增殖、诱导癌细胞凋亡与调控下游蛋白的表达有关。有文献报道,miR-214 可通过激活 TR53、抑制 RELA、CTNNB1 和 STAT 的表达抑制宫颈癌细胞增殖^[13-14]。miR-214 抑制宫颈癌细胞增殖和迁移的具体作用机制尚不明确,有待进一步探讨。PAK4 是 PAK 家族的成员之一,是细胞骨架重构和细胞迁移的基础^[15],其高表达在多种癌症的发生和癌细胞迁移过程中发挥重要作用^[16]。

有研究表明,PAK4 在宫颈癌中的高表达与宫颈癌患者的预后密切相关^[17]。本研究发现,上调 miR-214-5p 的表达能明显降低 HeLa 细胞 PAK4 的 mRNA 及蛋白表达水平,下调 miR-214-5p 的表达能明显增加 HeLa 细胞 PAK4 mRNA 及蛋白表达水平,提示 miR-214-5p 可能可靶向调控 PAK4 的表达。生物信息预测发现 miR-214-5p 基因序列上存在连续的 PAK4 结合位点,荧光素酶实验进一步表明 PAK4 能靶向结合 miR-214-5p,表明 PAK4 是 miR-214-5p 的下游靶标之一。

癌细胞的无限增殖是导致癌症发生的重要机制之一。miR-214-5p 能抑制多种癌细胞增殖。研究表明,miR-214-5p 能抑制骨肉瘤细胞增殖,其作用机制与下调促癌因子 ROCK 的表达有关^[18]。miR-214-5p 还能通过 PTEN 调控 PI3K/AKT 信号通路抑制卵巢癌细胞增殖^[19]。Qiang 等^[20]研究发现,miR-214-5p 还能通过靶向调控 Plexin-B1 抑制宫颈癌 HeLa 细胞生长。但 miR-214-5p 是否能通过调控 PAK4 的表达影响宫颈癌细胞的生长并不清楚。本研究发现 miR-214 mimic 转染细胞 5 d 后,HeLa 细胞的生长倍数明显降低,PAK4 高表达能明显升高宫颈癌 HeLa 细胞生长倍数,这与之前的研究报道一致^[21]。此外,pc-PAK4 还能明显减弱 miR-214 mimic 对 HeLa 细胞活性的抑制作用,表明 miR-214-5p 抑制宫颈癌 HeLa 细胞活力与下调 PAK4 的表达有关。

研究表明,miRNAs 能通过调控细胞凋亡影响癌症的发生发展。miR-433 能通过调控 AKT 和 β -catenin 信号通路诱导宫颈癌细胞凋亡^[22]。Wang 等^[23]研究发现,上调 miR-126-5p 表达能通过诱导宫颈癌细胞凋亡,作用机制与调控凋亡相关蛋白 BCL-2 的表达有关。miR-214 可通过调控 COP1-p53 通路诱导血管内皮瘤细胞凋亡,减缓血管内皮瘤发展^[24]。本研究结果表明,miR-214-5p 具有能诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的作用,但能被 PAK4 减弱,表明 miR-214-5p 能通过下调 PAK4 表达诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡。

综上所述,miR-214-5p 能靶向调控 PAK4 表达,还能降低宫颈癌 HeLa 细胞活性、诱导癌细胞凋亡,上调 PAK4 表达能明显减弱 miR-214-5p 对宫颈癌 HeLa 细胞活性的抑制作用和对细胞凋亡的诱导作用,表明 miR-214-5p 能通过靶向调控 PAK4

的表达降低宫颈癌 HeLa 细胞活性、诱导细胞凋亡。本研究通过细胞实验发现 miR-214-5p 可通过靶向 PAK4 影响宫颈癌 HeLa 细胞活性和凋亡,为临床宫颈癌的治疗提供了新思路,其动物体内实验有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 蓝家富. 防城港市 2 292 例女性宫颈 HPV 感染与基因分型分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3): 204-208.
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] 杨雯, 康佳蕊, 金贻铎, 等. PD-1 及 PD-L1 在宫颈上皮内瘤变及鳞癌中表达差异性的临床研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(2): 78-84.
- [4] Laukkanen P, Läärä E, Koskela P, et al. Population fraction of cervical neoplasia attributable to high-risk human papillomaviruses[J]. Future Oncol, 2010, 6(5): 709-716.
- [5] 杜文霞, 姬霞. miR-193b 在宫颈癌中的表达与功能及其对化疗敏感性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(7): 1241-1245.
- [6] Banno K, Iida M, Yanokura M, et al. MicroRNA in cervical cancer: oncomirs and tumor suppressor miRs in diagnosis and treatment[J]. Sci World J, 2014, 2014: 178075.
- [7] Liu J, Sun H, Wang X, et al. Increased exosomal microRNA-21 and microRNA-146a levels in the cervicovaginal lavage specimens of patients with cervical cancer[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(1): 758-773.
- [8] 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.
- [9] Wen Z, Lei Z, Jin-An M, et al. The inhibitory role of miR-214 in cervical cancer cells through directly targeting mitochondrial transcription factor A (TFAM)[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2014, 35(6): 676-682.
- [10] Hua FF, Liu SS, Zhu LH, et al. MiRNA-338-3p regulates cervical cancer cells proliferation by targeting MACC1 through MAPK signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(23): 5342-5352.
- [11] Jiang W, Pan JJ, Deng YH, et al. Down-regulated serum microRNA-101 is associated with aggressive progression and poor prognosis of cervical cancer[J]. J Gynecol Oncol, 2017, 28(6): e75.
- [12] Yang Z, Chen S, Luan X, et al. MicroRNA - 214 is aberrantly expressed in cervical cancers and inhibits the growth of HeLa cells[J]. I-ubmb Life, 2009, 61(11): 1075-1082.
- [13] Chandrasekaran KS, Sathyanarayanan A, Karunakaran D. miR-214 activates TP53 but suppresses the expression of RELA, CTNNB1, and STAT3 in human cervical and colorectal cancer cells[J]. Cell Biochem Function, 2017, 35(7): 464-471.
- [14] Peng R, Men J, Ma R, et al. miR-214 down-regulates ARL2 and suppresses growth and invasion of cervical cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 484(3): 623-630.
- [15] Sheng N, Tan G, You W, et al. MiR-145 inhibits human colorectal cancer cell migration and invasion via PAK4-dependent pathway[J]. Cancer Med, 2017, 6(6): 1331-1340.
- [16] Guo Q, Su N, Zhang J, et al. PAK4 kinase-mediated SCG10 phosphorylation involved in gastric cancer metastasis[J]. Oncogene, 2014, 33(25): 3277-3287.
- [17] Shu XR, Wu J, Sun H, et al. PAK4 confers the malignance of cervical cancers and contributes to the cisplatin-resistance in cervical cancer cells via PI3K/AKT pathway[J]. Diagn Pathol, 2015, 10(1): 177.
- [18] Zhang M, Wang D, Zhu T, et al. miR-214-5p targets ROCK1 and suppresses proliferation and invasion of human osteosarcoma cells[J]. Oncol Res, 2017, 25(1): 75-81.
- [19] Liu J, Chen W, Zhang H, et al. miR-214 targets the PTEN-mediated PI3K/Akt signaling pathway and regulates cell proliferation and apoptosis in ovarian cancer[J]. Oncol Lett, 2017, 14(5): 5711-5718.
- [20] Qiang R, Wang F, Shi LY, et al. Plexin-B1 is a target of miR-214 in cervical cancer and promotes the growth and invasion of HeLa cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(4): 632-641.
- [21] Kim H, Woo DJ, Kim SY, et al. p21-activated kinase 4 regulates HIF-1 α translation in cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 486(2): 270-276.
- [22] Liang C, Ding J, Yang Y, et al. MicroRNA-433 inhibits cervical cancer progression by directly targeting metadherin to regulate the AKT and β -catenin signalling pathways[J]. Oncol Rep, 2017, 38(6): 3639-3649.
- [23] Wang C, Zhou B, Liu M, et al. miR-126-5p Restoration promotes cell apoptosis in cervical cancer by targeting Bcl2[J]. Oncol Res, 2017, 25(4): 463-470.
- [24] Heishima K, Mori T, Sakai H, et al. MicroRNA-214 promotes apoptosis in canine hemangiosarcoma by targeting the COP1-p53 axis[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137361.

(责任编辑: 冉明会)