

马钱苷联合 *miR-3619-5p* 靶向迁移侵袭增强因子 1 对宫颈癌 SiHa 细胞迁移和凋亡的影响

冯双苗¹, 张化莲¹, 袁有华^{2*}

1. 驻马店市中心医院 产科, 河南 驻马店 463000

2. 河南省人民医院 检验科, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 研究马钱苷联合 *miR-3619-5p* 靶向迁移侵袭增强因子 1 (migration and invasion enhancer 1, MIEN1) 对宫颈癌 SiHa 细胞迁移和凋亡的影响。方法 采用 qRT-PCR 法检测宫颈癌 SiHa、Hela、CasKi 细胞和正常宫颈上皮 Ect1/E6E7 细胞中 *miR-3619-5p* mRNA 表达。在宫颈癌 SiHa 细胞中转染 *miR-3619-5p* mimics 上调 *miR-3619-5p* 的表达, 给予马钱苷处理, 采用 CCK-8 法分析细胞增殖; 流式细胞术分析细胞凋亡; Transwell 小室分析细胞迁移和侵袭能力的变化; Western blotting 法分析剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cystein-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 和基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloprotease-2, MMP-2) 蛋白表达。生物信息学软件预测 *miR-3619-5p* 的靶基因, 利用荧光素酶报告系统鉴定二者的靶向关系。在宫颈癌 SiHa 细胞中共转染 *miR-3619-5p* mimics 和 MIEN1 过表达载体, 考察细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力的变化。结果 宫颈癌 SiHa、Hela、CasKi 细胞中 *miR-3619-5p* mRNA 表达水平低于正常宫颈上皮 Ect1/E6E7 细胞 ($P < 0.05$), 并且宫颈癌 SiHa 细胞中 *miR-3619-5p* 表达水平最低。上调 *miR-3619-5p*、马钱苷处理或二者联合处理后的宫颈癌 SiHa 细胞增殖、迁移和侵袭能力均下降 ($P < 0.05$), 细胞凋亡升高 ($P < 0.05$), 细胞 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), MMP-2 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), 并且二者联合处理后对细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的作用更强。*miR-3619-5p* 靶向促进 MIEN1 表达。MIEN1 过表达载体逆转马钱苷联合 *miR-3619-5p* 对宫颈癌 SiHa 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的作用 ($P < 0.05$)。结论 马钱苷联合 *miR-3619-5p* 靶向 MIEN1 能够抑制宫颈癌 SiHa 细胞增殖、迁移、侵袭能力, 并促进细胞凋亡。

关键词: 马钱苷; 宫颈癌; *miR-3619-5p*; 迁移侵袭增强因子 1; 凋亡; 侵袭

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)14-4409-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.020

Effect of loganin combined with *miR-3619-5p* targeting MIEN1 on migration and apoptosis of cervical cancer SiHa cells

FENG Shuang-miao¹, ZHANG Hua-lian¹, YUAN You-hua²

1. Department of Production, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

2. Department of Laboratory Medicine, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of loganin combined with *miR-3619-5p* targeting migration and invasion enhancer 1 (MIEN1) on migration and apoptosis of cervical cancer SiHa cells. **Methods** *miR-3619-5p* mRNA expression in cervical cancer SiHa, Hela, CasKi cells and normal cervical epithelial Ect1/E6E7 cells were detected by qRT-PCR. Cervical cancer SiHa cells were transfected with *miR-3619-5p* mimics to up-regulate the expression of *miR-3619-5p* and treated with loganin. Cell proliferation was analyzed by CCK-8 method; Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry; Migration and invasion abilities of cells were analyzed by Transwell chamber; Cleaved cystein-aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3) and matrix metalloprotease-2 (MMP-2) protein expressions were detected by Western blotting. Bioinformatics software was used to predict the target genes of *miR-3619-5p*, and luciferase reporter system was used to identify the targeting relationship between the two. Cervical cancer SiHa cells were co-transfected with *miR-3619-5p* mimics and MIEN1 overexpression vector to investigate the changes in cell proliferation, apoptosis, migration and invasion. **Results** *miR-3619-5p* mRNA expression level in cervical cancer SiHa, Hela and CasKi cells was lower than that in normal cervical epithelial Ect1/E6E7 cells ($P < 0.05$), and *miR-3619-5p* expression level in cervical cancer SiHa cells was the

收稿日期: 2022-01-21

作者简介: 冯双苗, 硕士, 副主任医师, 研究方向为妇科肿瘤。E-mail: fsmiao0607@163.com

*通信作者: 袁有华, 本科, 副主任技师, 研究方向为肿瘤细胞凋亡。E-mail: yuanyouhua1968@163.com

lowest. After up-regulation of *miR-3619-5p*, given loganin or a combination of two treatments, cells proliferation, migration and invasion abilities were decreased ($P < 0.05$), cell apoptosis was increased ($P < 0.05$), cleaved Caspase-3 protein expression was increased ($P < 0.05$), and MMP-2 protein expression was decreased ($P < 0.05$). And combined treatment of two had a stronger effect on cells proliferation, apoptosis, invasion and migration. *miR-3619-5p* targeted MIEN1 expression. MIEN1 overexpression vector reversed the effects of loganin combined with *miR-3619-5p* on proliferation, apoptosis, migration and invasion of cervical cancer SiHa cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Loganin combined with *miR-3619-5p* targeting MIEN1 can inhibit the proliferation, migration and invasion of cervical cancer SiHa cells, and promote cell apoptosis.

Key words: loganin; cervical cancer; *miR-3619-5p*; migration and invasion enhancement factor 1; apoptosis; invasion

宫颈癌是引起女性死亡的主要恶性肿瘤之一，是目前世界范围内的第4大癌症，严重威胁着广大女性的生命健康^[1-2]。中药以及靶向基因治疗在肿瘤中的研究最为广泛，二者有不良反应小、安全性高等特点，可能是未来肿瘤治疗的重要途径。

马钱苷是从山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 中提取出的一种环烯醚萜类化合物，具有营养神经、免疫调节、改善氧化应激等作用^[3]。研究发现，马钱苷能够诱导肿瘤细胞凋亡并抑制其转移，马钱苷处理后的肝癌细胞凋亡水平增加，胃癌细胞转移能力降低^[4-5]。

miRNA 是非编码 RNA，在很多生理以及病理过程中均有调节作用，与胚胎发育、细胞生长、细胞运动等有关^[6]。研究显示，miRNA 和肿瘤的关系十分密切，miRNA 是未来肿瘤治疗的分子靶点^[7]。*miR-3619-5p* 是一个在前列腺癌、甲状腺癌等肿瘤中表达下调的调控因子，在肿瘤进展中发挥抑制作用^[8-9]。目前马钱苷联合 *miR-3619-5p* 对宫颈癌细胞生物学行为的影响尚不清楚。本研究以宫颈癌 SiHa 细胞为研究对象，探讨马钱苷联合 *miR-3619-5p* 在体外宫颈癌细胞恶性表型中的功能，为马钱苷联合 *miR-3619-5p* 治疗宫颈癌提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞

正常宫颈上皮 Ect1/E6E7 细胞(批号 QCB1077)购自上海钦诚生物科技有限公司；宫颈癌 SiHa (批号 CL-0210)、HeLa (批号 CL-0101)、CasKi (批号 CL-0048) 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

mirVana miRNA 试剂盒(批号 638369)、mir-X miRNA qRT-PCR SYBR 试剂盒(批号 638314)购自美国 Clontech 公司；剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cystein-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 抗体(批号 ab179517)购自美国 Abcam 公司；*miR-3619-5p* mimics、mimics control、迁移侵

袭增强因子 1 (migration and invasion enhancer 1, MIEN1) 过表达载体 (pcDNA3.1-MIEN1)、阴性对照载体 (pcDNA3.1) 均由北京安必奇生物科技有限公司构建合成；基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloprotease-2, MMP-2) 抗体(批号 ml085664)、MIEN1 抗体(批号 ml091507)购自上海酶联生物科技有限公司；甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、羊抗兔二抗购自北京中杉金桥公司；马钱苷(批号 BP0884, 质量分数 >98%) 购自成都普瑞法科技开发有限公司。

1.3 仪器

荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)；Varioskan LUX 酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；C6 型流式细胞仪(美国 BD 公司)；微管离心机(美国 Axygen 公司)；1-14K 型低温离心机(美国 Sigma 公司)；垂直电泳槽、电泳仪(北京六一生物科技有限公司)；显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 qRT-PCR 分析宫颈癌细胞 *miR-3619-5p* 表达

分别收集处于对数生长期的宫颈癌 SiHa、HeLa、CasKi 细胞和正常宫颈上皮 Ect1/E6E7 细胞，按照试剂盒说明书提取细胞中总 RNA 并合成 cDNA，进行 qRT-PCR 分析。将 *U6* 作为 *miR-3619-5p* 的内参。引物序列：*miR-3619-5p* 上游引物 5'-ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG-3'，下游引物 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'；*U6* 上游引物 5'-TTGAGGCTCTGCAGCTTAG-3'，下游引物 5'-CTGTGGTGGTTTACAAAGTAATT-3'。

2.2 CCK-8 检测马钱苷对宫颈癌细胞增殖的影响

将宫颈癌 SiHa 细胞以 3000 个/孔接种到 96 孔板内，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养过夜，吸去培养基，分别加入含有马钱苷最终质量浓度为 10、25、50、100、200 μg/mL 的培养基，对照组加入不含药物的培养基，培养 24 h 后，每孔加入 10 μL 的

CCK-8 溶液, 于振荡仪充分混合 1 min, 37 °C 继续孵育 3 h。采用酶标仪测定每孔在 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 实验分组

宫颈癌 SiHa 细胞分成对照组、马钱苷+miR-NC 组、miR-NC 组、miR-3619-5p 组和马钱苷+miR-3619-5p 组, 马钱苷+miR-NC 组和 miR-NC 组均为转染 mimics control 后的细胞, miR-3619-5p 组和马钱苷+miR-3619-5p 组均为转染 miR-3619-5p mimics 后的细胞, 马钱苷+miR-NC 组和马钱苷+miR-3619-5p 组细胞在实验开始时加入最终质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的马钱苷处理, 对照组细胞不进行处理。

按“2.1”项下方法检测对照组、miR-NC 组和 miR-3619-5p 组细胞 miR-3619-5p mRNA 表达。

2.4 CCK-8 检测马钱苷联合 miR-3619-5p 对宫颈癌细胞增殖的影响

对照组、马钱苷+miR-NC 组、miR-NC 组、miR-3619-5p 组和马钱苷+miR-3619-5p 组细胞培养 24 h 后, 按照“2.2”项下方法检测细胞存活率。

2.5 流式细胞术分析马钱苷联合 miR-3619-5p 对宫颈癌细胞凋亡的影响

对照组、马钱苷+miR-NC 组、miR-NC 组、miR-3619-5p 组和马钱苷+miR-3619-5p 组细胞培养 24 h 后, 弃去上清液, 以 PBS 溶液洗涤, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化后, 离心, 收集细胞沉淀。以 PBS 溶液将细胞润洗 3 次, 加入 500 μL 的 Binding Buffer 溶液 (细胞密度为 1×10^6 个/mL), 加入 5 μL Annexin V-FITC, 室温避光孵育 10 min; 加入 5 μL 碘化丙啶 (PI), 室温避光孵育 10 min, 立即采用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

2.6 Transwell 小室分析马钱苷联合 miR-3619-5p 对宫颈癌细胞迁移和侵袭的影响

2.6.1 迁移实验 对照组、马钱苷+miR-NC 组、miR-NC 组、miR-3619-5p 组和马钱苷+miR-3619-5p 组细胞分别用无血清的细胞培养基悬浮 (细胞密度为 1×10^6 个/mL), 吸取 200 μL 各组细胞加入到 Transwell 小室的上室中, 同时吸取 500 μL 含血清的细胞培养基加入到小室的下室内, 于 37 °C 的 CO₂ 培养箱中培养 24 h。取出小室, 用棉签小心地把上室底膜中的细胞擦除, 以 4% 多聚甲醛固定上室底膜内的细胞, 用 0.1% 结晶紫染色, 加入 PBS 溶液洗涤 2 次。将小室放在显微镜下并随机选择 5 个视

野, 分别计数穿膜的细胞数量, 计算平均值, 为细胞迁移数目。

2.6.2 侵袭实验 按 1:9 比例将基质胶和 D-hanks 液混合, 吸取 20 μL 上述溶液加入到 Transwell 小室的上室内, 于 37 °C 培养箱中孵育 4 h, 待基质胶凝固后, 吸除残留的液体。按“2.6.1”项下方法处理并计算细胞侵袭数目。

2.7 Western blotting 检测马钱苷联合 miR-3619-5p 对宫颈癌细胞 cleaved Caspase-3 和 MMP-2 蛋白表达的影响

对照组、马钱苷+miR-NC 组、miR-NC 组、miR-3619-5p 组和马钱苷+miR-3619-5p 组细胞培养 24 h 后, 弃去上清液, 加入 RIPA 裂解液, 于冰上裂解 20 min, 4 °C、12 000 $\times g$ 离心 10 min, 吸取上清液, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 牛血清白蛋白溶液, 室温封闭 2 h。分别加入相应抗体, 4 °C 孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育 2 h。加入 ECL 发光液显影, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.8 miR-3619-5p 与 MIEN1 靶向关系预测和鉴定

利用生物信息学软件 Targetscan 分析 miR-3619-5p 可能的靶基因, 根据荧光素酶报告系统对靶向关系进行鉴定。将含有 MIEN1 的 3'-UTR 端结合位点的 WT 荧光素酶报告载体和含有突变后的 MIEN1 的 3'-UTR 端结合位点的 MUT 荧光素酶报告载体分别和 miR-3619-5p mimics、mimics control 共转染到宫颈癌 SiHa 细胞中, 培养 24 h 后, 利用荧光素酶活性测定试剂盒对细胞荧光素酶活性进行检测分析。WT 和 MUT 均由武汉巴菲尔生物技术服务有限公司构建。收集对照组、miR-NC 组、miR-3619-5p 组细胞, 利用 Western blotting 法检测细胞 MIEN1 蛋白表达。

2.9 MIEN1 过表达载体的逆转作用检测

宫颈癌 SiHa 细胞分别共转染 miR-3619-5p mimics 与阴性对照载体、miR-3619-5p mimics 与 MIEN1 过表达载体, 然后用含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的马钱苷处理 24 h, 记为马钱苷+miR-3619-5p+Vector 组和马钱苷+miR-3619-5p+MIEN1 组。按“2.4”项下方法检测细胞存活率, 按“2.5”项下方法检测细胞凋亡枪口, 按“2.6”项下方法检测细胞的迁移和侵袭能力, 按“2.7”项下方法检测细胞 cleaved Caspase-3、MMP-2 和 MIEN1 蛋白表达情况。

2.10 统计学分析

实验数据经 SPSS 21.0 软件分析后, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 *t* 检验, 多组比较用单因素方差。

3 结果

3.1 miR-3619-5p 在宫颈癌细胞中相对低表达

如表 1 所示, 宫颈癌 SiHa、Hela、CasKi 细胞 miR-3619-5p mRNA 表达水平明显低于正常宫颈上皮 Ect1/E6E7 细胞 ($P < 0.05$), 并且宫颈癌 SiHa 细胞中 miR-3619-5p 表达水平最低。

3.2 马钱苷抑制宫颈癌 SiHa 细胞增殖

如表 2 所示, 与对照组比较, 马钱苷 (25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组 SiHa 细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的马钱苷处理后的细胞存活率接近 50%, 因此选择 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 马钱苷进行后续实验。

3.3 miR-3619-5p mimics 上调宫颈癌 SiHa 细胞中 miR-3619-5p mRNA 表达

如表 3 所示, miR-3619-5p 组 SiHa 细胞 miR-3619-5p mRNA 表达水平显著高于 miR-NC 组 ($P < 0.05$)。表明 miR-3619-5p mimics 上调宫颈癌 SiHa 细胞中 miR-3619-5p mRNA 表达水平。

表 1 宫颈癌 SiHa、Hela、CasKi 细胞和正常宫颈上皮 Ect1/E6E7 细胞中 miR-3619-5p mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

| 细胞 | miR-3619-5p mRNA 相对表达量 |
|-----------|------------------------|
| Ect1/E6E7 | 1.00 ± 0.11 |
| SiHa | 0.35 ± 0.04* |
| Hela | 0.46 ± 0.05* |
| CasKi | 0.68 ± 0.07* |

与 Ect1/E6E7 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs Ect1/E6E7 group

表 2 马钱苷对宫颈癌 SiHa 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Effect of loganin on proliferation of cervical cancer SiHa cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

| 组别 | 质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ | 存活率/% |
|-----|--|----------------|
| 对照 | — | 100.00 ± 12.02 |
| 马钱苷 | 10 | 93.25 ± 8.15 |
| | 25 | 86.32 ± 5.16* |
| | 50 | 75.49 ± 6.33* |
| | 100 | 52.01 ± 6.14* |
| | 200 | 40.21 ± 4.78* |

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

表 3 miR-3619-5p mimics 转染后的宫颈癌 SiHa 细胞中 miR-3619-5p mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 3 miR-3619-5p mRNA expression in cervical cancer SiHa cells transfected with miR-3619-5p mimics ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

| 组别 | miR-3619-5p mRNA 相对表达量 |
|-------------|------------------------|
| 对照 | 1.00 ± 0.11 |
| miR-NC | 0.98 ± 0.09 |
| miR-3619-5p | 2.65 ± 0.23* |

与 miR-NC 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs miR-NC group

3619-5p mRNA 表达水平显著高于 miR-NC 组 ($P < 0.05$)。表明 miR-3619-5p mimics 上调宫颈癌 SiHa 细胞中 miR-3619-5p mRNA 表达水平。

3.4 马钱苷联合 miR-3619-5p 对宫颈癌 SiHa 细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和 cleaved Caspase-3 和 MMP-2 蛋白表达的影响

如图 1、2 和表 4 所示, 与 miR-NC 组比较, miR-3619-5p 组、马钱苷+miR-NC 组和马钱苷+

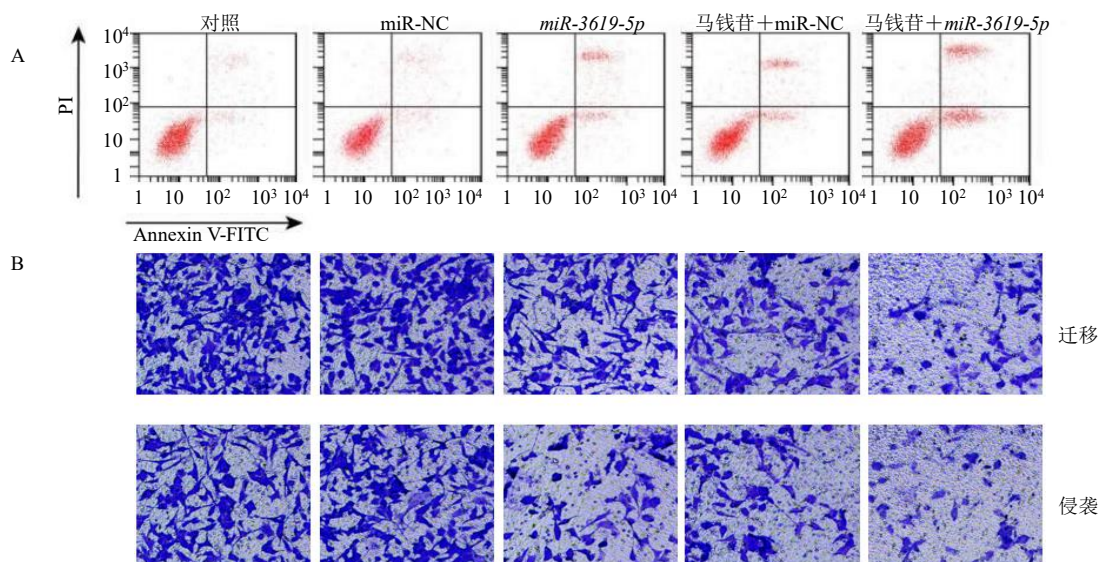


图 1 马钱苷联合 miR-3619-5p 对宫颈癌 SiHa 细胞凋亡 (A)、迁移及侵袭 (B) 的影响

Fig. 1 Effect of loganin combined with miR-3619-5p on apoptosis (A), migration and invasion (B) in cervical cancer SiHa cells

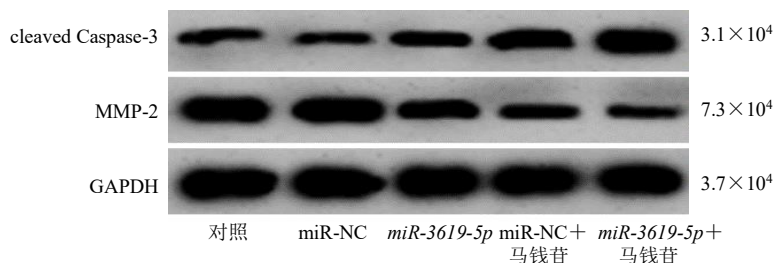


图2 马钱苷联合 miR-3619-5p 对宫颈癌 SiHa 细胞 cleaved Caspase-3 和 MMP-2 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of loganin combined with miR-3619-5p on cleaved Caspase-3 and MMP-2 protein expressions in cervical cancer SiHa cells

表4 马钱苷联合 miR-3619-5p 对宫颈癌 SiHa 细胞存活率、凋亡率、侵袭数目、迁移数目及 cleaved Caspase-3 和 MMP-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 4 Effect of loganin combined with miR-3619-5p on survival rate, apoptosis rate, invasion number, migration number and cleaved Caspase-3 and MMP-2 protein expressions in cervical cancer SiHa cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

| 组别 | 剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 存活率/% | 凋亡率/% | 侵袭数目 | 迁移数目 | cleaved Caspase-3 蛋白表达量 | MMP-2 蛋白表达量 |
|-----------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------|----------------|
| 对照 | — | 100.00 ± 9.96 | 4.11 ± 0.30 | 93.96 ± 9.94 | 136.84 ± 12.45 | 0.32 ± 0.03 | 0.90 ± 0.10 |
| miR-NC | — | 99.51 ± 9.78 | 4.26 ± 0.43 | 96.23 ± 8.76 | 134.36 ± 12.08 | 0.31 ± 0.04 | 0.89 ± 0.07 |
| miR-3619-5p | — | 63.23 ± 5.58* | 19.68 ± 1.74* | 69.20 ± 5.14* | 100.16 ± 10.53* | 0.45 ± 0.05* | 0.65 ± 0.06* |
| 马钱苷+miR-NC | 100 | 53.41 ± 5.26* | 21.56 ± 2.50* | 60.42 ± 4.36* | 90.32 ± 8.77* | 0.63 ± 0.07* | 0.47 ± 0.04* |
| 马钱苷+miR-3619-5p | 100 | 32.05 ± 2.95*#& | 29.36 ± 2.75*#& | 42.74 ± 4.45*#& | 63.23 ± 5.70*#& | 0.88 ± 0.08*#& | 0.38 ± 0.03*#& |

与 miR-NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-3619-5p 组比较: # $P < 0.05$; 与马钱苷+miR-NC 组比较: & $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs miR-NC group; # $P < 0.05$ vs miR-3619-5p group; & $P < 0.05$ vs loganin + miR-NC group

miR-3619-5p 组宫颈癌 SiHa 细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), 细胞迁移和侵袭数目增多 ($P < 0.05$), cleaved Caspase-3 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), MMP-2 蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$); 与 miR-3619-5p 组和马钱苷+miR-NC 组比较, 马钱苷+miR-3619-5p 组宫颈癌 SiHa 细胞存活率降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), 细胞迁移和侵袭数目增多 ($P < 0.05$), cleaved

Caspase-3 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), MMP-2 蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$)。

3.5 miR-3619-5p 靶向促进 MIEN1 表达

生物信息学软件分析 miR-3619-5p 和 MIEN1 的 3'-UTR 端结合位点见图 3; WT 和 miR-3619-5p mimics 共转染后的细胞荧光素酶活性降低 (表 5)。如图 4 和表 6 所示, miR-3619-5p 组 SiHa 细胞 MIEN1 蛋白表达水平显著低于 miR-NC 组 ($P < 0.05$)。

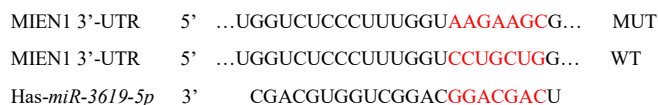


图3 miR-3619-5p 靶向调控 MIEN1

Fig. 3 miR-3619-5p targets MIEN1

表5 各组荧光素酶活性 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 5 Luciferase activity in each group ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

| 组别 | WT | MUT |
|-------------|--------------|-------------|
| miR-NC | 1.00 ± 0.08 | 1.00 ± 0.09 |
| miR-3619-5p | 0.43 ± 0.05* | 0.98 ± 0.13 |

与 miR-NC 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs miR-NC group

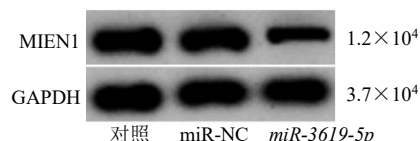


图4 Western blotting 检测 MIEN1 蛋白表达

Fig. 4 MIEN1 protein expression detected by Western blotting

表 6 *miR-3619-5p* mimics 转染后的宫颈癌 SiHa 细胞中 MIEN1 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 6 MIEN1 protein expression level in cervical cancer SiHa cells transfected with *miR-3619-5p* mimics ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

| 组别 | MIEN1 蛋白相对表达量 |
|--------------------|---------------|
| 对照 | 0.96 ± 0.10 |
| miR-NC | 0.95 ± 0.11 |
| <i>miR-3619-5p</i> | 0.53 ± 0.04* |

与 miR-NC 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs miR-NC group

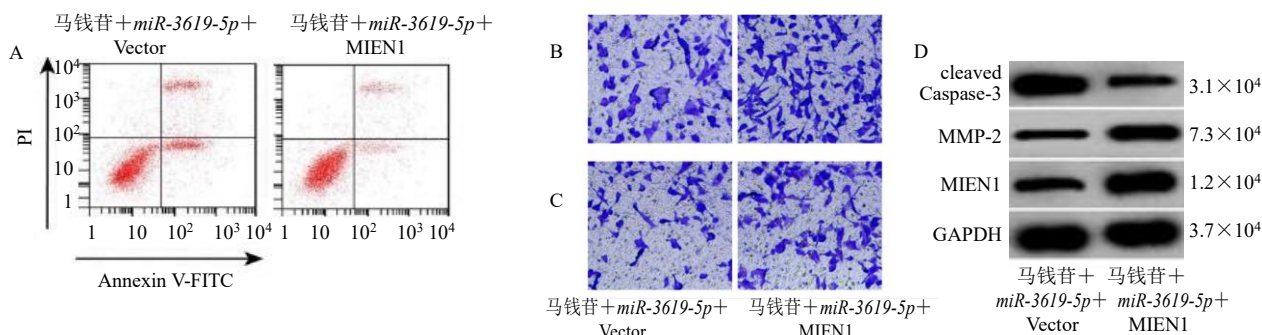


图 5 MIEN1 对马钱苷联合 *miR-3619-5p* 影响宫颈癌 SiHa 细胞凋亡 (A)、迁移 (B)、侵袭 (C) 及 cleaved Caspase-3、MMP-2 和 MIEN1 蛋白表达 (D) 的作用

Fig. 5 Effect of MIEN1 on apoptosis (A), migration (B), invasion (C) and cleaved Caspase-3, MMP-2 and MIEN1 protein expressions (D) in cervical cancer SiHa cells affected by loganin combined with *miR-3619-5p*

表 7 MIEN1 过表达载体、*miR-3619-5p* mimics 转染后经马钱苷处理的宫颈癌 SiHa 细胞存活率、凋亡率、侵袭数目、迁移数目及 cleaved Caspase-3、MMP-2 和 MIEN1 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 7 Survival rate, apoptosis rate, invasion number, migration number and cleaved Caspase-3, MMP-2 and MIEN1 protein expression levels in cervical cancer SiHa cells transfected with MIEN1 overexpression vector and *miR-3619-5p* mimics and treated with loganin ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

| 组别 | 剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 存活率/% | 凋亡率/% | 侵袭数目 | 迁移数目 | cleaved Caspase-3 蛋白表达量 | MMP-2 蛋白表达量 | MIEN1 蛋白表达量 |
|--------------------------------|---|-----------------|---------------|---------------|---------------|----------------------------|----------------|----------------|
| 马钱苷+ <i>miR-3619-5p</i> | 100 | 100.00 ± 10.25 | 27.86 ± 2.17 | 43.65 ± 3.26 | 60.95 ± 6.32 | 0.89 ± 0.09 | 0.36 ± 0.04 | 0.45 ± 0.04 |
| 马钱苷+ <i>miR-3619-5p</i> +MIEN1 | 100 | 169.32 ± 14.15* | 14.02 ± 1.36* | 68.62 ± 5.17* | 88.77 ± 6.38* | 0.40 ± 0.05* | 0.76 ± 0.06* | 0.99 ± 0.12* |

与马钱苷+*miR-3619-5p* 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs loganin + *miR-3619-5p* group

4 讨论

研究发现, 马钱苷对糖尿病、帕金森病等多种疾病均有改善作用^[10-11]; 马钱苷能够激活肝癌细胞中的凋亡通路^[4]; 马钱苷抑制胃癌细胞转移能力^[5]; 马钱苷可以降低结肠癌细胞的增殖能力^[12]。本研究结果显示, 马钱苷能够抑制宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移, 促进细胞凋亡, 提示马钱苷具有抑制宫颈癌的作用。

细胞的迁移、侵袭以及凋亡发生是一个多基因、多步骤的复杂调控过程。肿瘤细胞迁移和侵袭过程

3.6 上调 MIEN1 对马钱苷联合 *miR-3619-5p* 调控宫颈癌 SiHa 细胞细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和 cleaved Caspase-3、MMP-2 和 MIEN1 蛋白表达的影响

如图 5 和表 7 所示, 与马钱苷+*miR-3619-5p*+Vector 组比较, 马钱苷+*miR-3619-5p*+MIEN1 组 SiHa 细胞存活率明显升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$), 细胞侵袭和迁移数目增加 ($P < 0.05$), 细胞 MMP-2、MIEN1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), cleaved Caspase-3 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。

中, 需要先将细胞外基质降解^[13]。MMPs 是存在于人体组织中的基质降解酶, 包含多个成员, 能够将细胞外基质中的不同组分降解^[14]。MMP-2 是 MMPs 成员之一, 其表达改变和肿瘤的转移能力有关, MMP-2 表达水平越高, 细胞转移能力越强^[15]。Caspase 是细胞凋亡进展中的凋亡相关蛋白家族, 其蛋白成员只有被剪切后形成活化的 Caspase 才能激活细胞凋亡^[16]。Caspase-3 是位于 Caspase 凋亡反应中的下游因子, 在细胞凋亡中有执行作用, Caspase-3 活化形成 cleaved Caspase-3, 从而不可逆地激活细

胞凋亡^[17]。结果显示, 马钱苷上调 cleaved Caspase-3 蛋白表达, 下调 MMP-2 蛋白表达, 提示马钱苷促进细胞凋亡, 并抑制细胞侵袭、迁移, 这与细胞凋亡、侵袭和迁移检测结果一致。

宫颈癌的发生和其他肿瘤一样, 均受到基因的调节作用, 这些基因通过复杂的网络最终影响了肿瘤进程^[18]。研究显示, miRNA 作为一种没有开放阅读框的小分子 RNA, 具有十分广泛的作用, 在细胞生长、衰老、代谢等生理进展中发挥功能^[19]。miRNA 在肿瘤中的作用引起人们的广泛关注, 肿瘤组织有着与正常组织不同的 miRNA 表达谱, 差异表达的 miRNA 可能是肿瘤治疗的靶点^[20]。研究发现, miR-3619-5p 在肺癌、膀胱癌、前列腺癌等多种肿瘤中发挥抑制作用, 其在肿瘤组织中表达下调, 可能是一个肿瘤抑制因子^[8,21-22]。结果显示, miR-3619-5p 在宫颈癌细胞中低表达, 并且上调 miR-3619-5p 可以降低宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭能力, 激活细胞凋亡途径, 提示 miR-3619-5p 在宫颈癌进展中可能发挥抑癌基因的作用。此外, 本研究发现, miR-3619-5p 和马钱苷联合处理后的宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭能力进一步被抑制, 细胞凋亡水平更高, 提示 miR-3619-5p 和马钱苷联合可能是未来宫颈癌治疗的潜在途径。

miRNA 发挥作用和调控下游靶基因的表达有关, 其能够和靶 mRNA 的 3'-UTR 端互补结合, 降低下游靶蛋白的表达^[23]。miRNA 能够和多个靶基因作用, 一个靶基因可以同时受到很多 miRNA 的靶向调节作用, 因此, miRNA 通过这个复杂的网络影响生理和病理进程^[24]。研究显示, miR-3619-5p 靶向促进宫颈癌细胞中 MIEN1 的表达。MIEN1 是和肿瘤转移有关的调节因子, 已知 MIEN1 在宫颈癌中高表达, 并且下调 MIEN1 抑制宫颈癌细胞恶性生物学行为^[25]。本研究发现, 上调 MIEN1 能够逆转马钱苷联合 miR-3619-5p 对宫颈癌细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的作用, 提示马钱苷联合 miR-3619-5p 靶向 MIEN1 影响宫颈癌生物学行为。

综上, 马钱苷联合 miR-3619-5p 具有抑制宫颈癌进展的作用, 其可以在体外抑制宫颈癌细胞的侵袭、增殖、迁移, 激活细胞凋亡途径, 作用机制与靶向调控 MIEN1 有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Saei Ghare Naz M, Kariman N, Ebadi A, et al. Educational

interventions for cervical cancer screening behavior of women: A systematic review [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(4): 875-884.

[2] Kovachev S M. Cervical cancer and vaginal microbiota changes [J]. *Arch Microbiol*, 2020, 202(2): 323-327.

[3] 甘啸阳, 王威, 吕杨, 等. 马钱苷对 AGEs 致巨噬细胞极化的影响 [J]. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(1): 46-50.

[4] 张聪, 胡娜, 李珊, 等. 马钱苷对肝癌细胞 HepG2 增殖与凋亡的影响及机制研究 [J]. *中国药房*, 2020, 31(7): 782-788.

[5] 张艺, 张卓奇, 程华, 等. 马钱苷对胃癌细胞上皮-间充质转化的影响及其机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(11): 2004-2007.

[6] Chen L, Heikkinen L, Wang C L, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(5): 1836-1852.

[7] Shao T T, Wang G J, Chen H, et al. Survey of miRNA-miRNA cooperative regulation principles across cancer types [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(5): 1621-1638.

[8] Li S M, Wang C H, Yu X, et al. miR-3619-5p inhibits prostate cancer cell growth by activating CDKN1A expression [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 241-248.

[9] Wang G, Wang X, Jin Y. LINC01410/miR-3619-5p/FOXO1 feedback loop regulates papillary thyroid carcinoma cell proliferation and apoptosis [J]. *Cancer Biotherapy Radiopharm*, 2019, 34(9): 572-580.

[10] 赵文望, 皮文霞, 蔡宝昌, 等. 马钱苷、莫诺苷对高糖致心肌细胞损伤的保护机制研究 [J]. *中成药*, 2016, 38(1): 160-163.

[11] 汪林芳, 黄术兵, 徐一达, 等. 马钱苷对 MPTP 诱导的 PC12 细胞自噬的作用研究 [J]. *神经药理学报*, 2016, 6(5): 14-21.

[12] 胡小红, 王美玲, 湛江城, 等. 马钱苷对结肠癌 SW480 细胞增殖的影响及机制初探 [J]. *广东药学院学报*, 2015, 31(1): 80-83.

[13] Ganguly S S, Hostetter G, Tang L, et al. Notch3 promotes prostate cancer-induced bone lesion development via MMP-3 [J]. *Oncogene*, 2020, 39(1): 204-218.

[14] Zhang S, Yang Y, Huang S, et al. SIRT1 inhibits gastric cancer proliferation and metastasis via STAT3/MMP-13 signaling [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9): 15395-15406.

[15] Cowell S, Carroll L, Lavdas I, et al. Towards an MMP-2-activated molecular agent for cancer imaging [J]. *Dalton Trans*, 2018, 47(5): 1530-1534.

[16] Zhou M, Liu X, Li Z, et al. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(4): 921-930.

- [17] Bernard A, Chevrier S, Beltjens F, *et al.* Cleaved caspase-3 transcriptionally regulates angiogenesis-promoting chemotherapy resistance [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(23): 5958-5970.
- [18] Laengsri V, Kerdpin U, Plabplueng C, *et al.* Cervical cancer markers: Epigenetics and microRNAs [J]. *Lab Med*, 2018, 49(2): 97-111.
- [19] Tiwari A, Mukherjee B, Dixit M. MicroRNA key to angiogenesis regulation: MiRNA biology and therapy [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2018, 18(3): 266-277.
- [20] 蒋雪梅, 权毅. 上调 miRNA-27a-3p 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2019, 54(2): 279-283.
- [21] Niu X C, Liu S, Jia L, *et al.* Role of MiR-3619-5p in β -catenin-mediated non-small cell lung cancer growth and invasion [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(4): 1527-1536.
- [22] Zhang Q, Miao S, Han X, *et al.* MicroRNA-3619-5p suppresses bladder carcinoma progression by directly targeting β -catenin and CDK2 and activating p21 [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 960.
- [23] Lu T X, Rothenberg M E. MicroRNA [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [24] Kappel A, Keller A. miRNA assays in the clinical laboratory: Workflow, detection technologies and automation aspects [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(5): 636-647.
- [25] 姚慧欣, 王钧峰, 吴金涛, 等. miR-136-5p 靶向 MIEN1 对宫颈癌细胞侵袭和迁移的调节及机制研究 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2020, 41(3): 362-368.

[责任编辑 李亚楠]