

• 基础研究 •

PTEN 抑制剂逆转靶向 microRNA-24 抑制宫颈癌发生、发展的机制探索

何海新 卢永伟 林翠波 吴宏清

【摘要】 目的 探讨 microRNA-24 (miR-24) 在宫颈癌 (CC) 的发生、形成中的作用和调控机制。**方法** 使用 HELA S3 细胞系进行裸鼠皮下成瘤实验, 采用免疫组织化学 (IHC) 检测细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、增殖细胞相关蛋白 Ki-67、上皮钙黏蛋白 (E-cadherin) 和波形蛋白 (Vimentin) 的表达来研究 miR-24 和张力蛋白同源磷酸酶基因 (PTEN) 对肿瘤生长的影响。**结果** miR-24 抑制剂组肿瘤重量降低; Cyclin D1、Ki-67 表达量降低, 细胞增殖能力被抑制; E-cadherin 表达增强, Vimentin 表达被抑制。miR-24 抑制剂 + si-PTEN 组的检测结果显示: si-PTEN 逆转了 miR-24 抑制剂的效果。**结论** miR-24 抑制剂抑制 CC 细胞系增殖和侵袭能力, 而 PTEN 的下调可逆转 miR-24 抑制剂对 CC 细胞系增殖和侵袭的影响。靶向 miR-24 可能为预防和治疗 CC 提供一种新的治疗策略。

【关键词】 miR-24; 宫颈癌; 调控; 张力蛋白同源磷酸酶基因

【中图分类号】 R734.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2024)07-0069-03

Mechanism exploration of reverse targeting of microRNA-24 by PTEN inhibitors to inhibit the occurrence and development of cervical cancer

HE Haixin, LU Yongwei, LIN Cuibo, WU Hongqing

Department of Gynecology, Fujian Cancer Hospital, Clinical Oncology School of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350014, China

【Abstract】 Objective To investigate the role of microRNA-24 (miR-24) in the pathogenesis, formation and regulation of cervical cancer (CC). **Methods** Subcutaneous tumor formation test of nude mice was conducted with HELA S3 cell line. The expressions of Cyclin D1, Ki-67, E-cadherin and Vimentin were detected by immunohistochemistry (IHC) to study the effects of miR-24 and PTEN on tumor growth. **Results** The tumor weight was significantly inhibited in miR-24 inhibitor group. The expression levels of Cyclin D1 and Ki-67 decreased, and cell proliferation was inhibited. E-cadherin expression was enhanced, while Vimentin expression was inhibited. The detection results of miR-24 inhibitor + si-PTEN group showed that si-PTEN reversed the effect of miR-24 inhibitor. **Conclusion** miR-24 inhibitors significantly inhibit the proliferation and invasion of CC cell lines, and down-regulation of PTEN can reverse the effects of miR-24 inhibitors on the proliferation and invasion of CC cell lines. Targeting miR-24 may provide a new therapeutic strategy for the prevention and treatment of CC.

【Key words】 miR-24; cervical cancer; regulation; PTEN

MicroRNAs (miRNAs) 是真核生物中广泛存在的一种长约 20~25 个核苷酸的内源性非编码单链小分子 RNA, 具有调节基因表达的功能^[1]。而 microRNA-24 (miR-24) 在肿瘤的发生、发展中具有复杂的功能, 因肿瘤的不同而作为肿瘤抑制因子或增强因子^[2-3]。Volinia 等^[4] 确定了 miR-24 是在肺癌、胃癌、宫颈癌 (cervical cancer, CC)、结肠癌和胰腺癌中表达上调的 miRNA, 而且 miR-24 的

表达和肿瘤的进展关系密切。但 miR-24 在 CC 的发生和进展中的作用和调控机制尚不明确。本实验拟在体内水平探索靶向 miR-24 是否发挥抑制 CC 细胞增殖和侵袭的能力, 并且该作用是否可被 PTEN 失活 (si-PTEN) 逆转。本研究结果可能为通过靶向 miR-24 预防和治疗 CC 提供一种新的治疗策略。

基金项目: 福建省卫健委科技计划项目 (2020CXA014)

作者单位: 福建医科大学肿瘤临床医学院 福建省肿瘤医院妇科, 福州 350014

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.07.022

1 材料与方法

1.1 细胞培养 本研究使用 HELA S3 细胞系 (ATCC, US)。在 37 °C 的细胞培养箱, 用含有 5% FBS、40 IU 青霉素的 4 500 mg/L 高糖型 DMEM 培养基培养细胞, 并给予 5% 的 CO₂ 和 95% 的 O₂。

1.2 裸鼠皮下成瘤实验 选择 6~8 周龄的 SPF 级 BALB/c 裸鼠 15 只, 实验动物生产许可证号为 SCXK (京) 2019-0010, 实验动物使用许可证号为 SYXK (闽) 2016-0006, 饲养于福建医科大学实验动物中心, 自由饮食。BALB/c 裸鼠购入后, 适应性喂养 1 周后, 开始移植瘤模型的构建。将 HELA S3 细胞 (5×10⁵ 个) 悬浮于 0.1 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 皮下注射到裸鼠肩胛骨部位。小鼠被分为 3 组, 8 只/组: 一组使用 miR-24 抑制剂 (Realgene, 中国) 处理, 另一组使用 miR-24 抑制剂和 si-PTEN (Realgene, 中国) 联合治疗, 对照组采用等体积的 PBS 处理。治疗每 3 天进行 1 次, 持续 3 周。治疗期结束后, 对小鼠实施安乐死, 并收集其肿瘤作进一步分析。测定肿瘤重量, 并对肿瘤组织采用免疫组织化学 (IHC) 检测相关指标的表达。

1.3 IHC 检测 所有组织均经 10% 中性福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 4 μm 厚连续切片备用。细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、增殖细胞相关蛋白 Ki-67、上皮钙黏蛋白 (E-cadherin) 和波形蛋白 (Vimentin) 和即用型快捷免疫组化 MaxVision™ 3 试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司, 按照试剂商提供的说明书进行操作。免疫组化判定方法: Vimentin 阳性 (+) 表现为细胞质棕黄色颗粒着色; Cyclin D1、Ki67 阳性 (+) 表现为细胞核的棕黄色着色; E-Cadherin 阳性 (+) 表现为细胞质、细胞膜棕黄色着色; 无明显阳性细胞为阴性。计算每张切片阳性细胞百分率, 无阳性细胞为阴性 (-), 阳性细胞数 < 10% 为弱阳性 (+), 10% ~ 30% 为阳性 (++) , > 30% 为强阳性 (+++) [5]。免疫组化结果由两名高年资病理医师采用双盲法独立阅片并取均值。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 18 软件进行统计分析, 计量资料符合正态分布者以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验或方差分析进行比较, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 张力蛋白同源磷酸酶基因 (PTEN) 表达下调可逆转 miR-24 抑制剂对体内肿瘤生长的抑制作用

裸鼠成瘤实验中各组肿瘤重量: 对照组为 (1.58 ± 0.17) g, miR-24 抑制剂组为 (0.57 ± 0.11) g, miR-24 抑制剂 + si-PTEN 组为 (1.20 ± 0.13) g, 各组间差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.2 PTEN 表达下调可逆转 miR-24 抑制剂对体内肿瘤细胞周期、增殖的影响 笔者检测了裸鼠成瘤实验中各组肿瘤组织的 Cyclin D1 和 Ki-67 的表达。miR-24 抑制剂组 IHC 检测结果显示: Cyclin D1 表达量从阳性 (++) 降低至弱阳性 (+) (图 1a 上、中), Ki-67 表达量从阳性 (++) 降低至弱阳性 (+) (图 1b 上、中), 细胞增殖能力被抑制; 而 miR-24 抑制剂 + si-PTEN 组的 IHC 实验结果显示: PTEN 的敲低可逆转该现象, Cyclin D1 表达量从弱阳性 (+) 增至强阳性 (+++) (图 1a 中、下), Ki-67 表达量从弱阳性 (+) 增至强阳性 (+++) (图 1b 中、下), 促进细胞增殖。图 1 见封四。

2.3 PTEN 表达下调可显著逆转 miR-24 抑制剂对体内肿瘤上皮间质转化 (EMT) 过程的影响 裸鼠成瘤实验中各组肿瘤组织 EMT 相关蛋白的表达: miR-24 抑制剂组 IHC 检测结果显示, E-cadherin 表达从阴性 (-) 增至弱阳性 (+) (图 2a 上、中), 而表达 Vimentin 的肿瘤细胞数、染色强度都有所减弱 (仍处于 > 30% 区间, 即 ++, 图 2b 上、中); 然而, miR-24 抑制剂对这些蛋白的作用通过 si-PTEN 处理即发生逆转: E-cadherin 表达从弱阳性 (+) 减至阴性 (-) (图 2a 中、下), 而表达 Vimentin 的肿瘤细胞数、染色强度均有轻微增加 (仍处于 > 30% 区间, 即 ++, 图 2b 中、下)。图 2 见封四。

3 讨论

近年来, 分子靶向治疗在临床实践中的应用越来越广泛, 成为治疗恶性肿瘤的又一有力武器。成熟 miRNA 可以识别特定靶 mRNA 的 3' UTR 区域, 并通过促进靶 mRNA 降解和抑制其翻译过程, 在转录后水平上对基因表达起到负调控作用 [6]。此外, miRNA 可能在肿瘤干细胞的自我更新、多元化和致瘤性特征中发挥重要作用 [7]。本研究结果提示, miR-24 抑制剂可抑制 Cyclin D1、Ki-67、E-cadherin 和 Vimentin 合成表达, 敲除 PTEN 逆转了 miR-24 抑制剂对细胞凋亡、细胞周期和 EMT 过程的影响。

Cyclin D1 是细胞周期中 G₁ 期进入 S 期的重要

调控因子,促进细胞增殖^[8];Ki-67 是检测细胞增殖活性的指标之一,其增殖指数高低与许多肿瘤的分化程度、浸润、转移及预后密切相关^[9];E-cadherin 及 Vimentin 参与维持细胞形态,保持细胞质的完整性,稳定细胞骨架,参与肿瘤转移及肿瘤细胞凋亡^[10-12]。本研究通过裸鼠成瘤实验,采用 IHC 检测 Cyclin D1、Ki-67、E-cadherin 和 Vimentin 的蛋白表达,发现抑制 miR-24 可显著抑制细胞增殖、迁徙、转移、肿瘤生长,同时促进细胞凋亡。然而,miR-24 抑制剂的影响可被 si-PTEN 逆转。在本研究中,笔者发现使用 miR-24 抑制剂可抑制肿瘤细胞增殖能力,而 si-PTEN 可逆转 miR-24 抑制剂对 CC 转移和生长的影响。本研究证明了 miR-24 可以促进 CC 的发展。miR-24 的进一步功能靶点还有待探索。针对 miR-24 的治疗策略为 CC 的治疗和预防提供了新的思路。本研究存在一些局限性:仅使用 IHC 这单一的方法检测裸鼠瘤体的蛋白表达差异,应增加其他检测方法,如实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)、蛋白质免疫印迹(WB)等方法进行多方面验证。

综上,miR-24 抑制剂能抑制 CC 细胞增殖和侵袭,其影响可被 si-PTEN 逆转。本研究可能为通过靶向 miR-24 治疗 CC 提供一种新的治疗思路。

参考文献

- [1] HU M, ZHU S, XIONG S, et al. MicroRNAs and the PTEN/PI3K/Akt pathway in gastric cancer [J]. *Oncology Reports*, 2019, 41 (3): 1439-1454.
- [2] LI Y Q, LU J H, BAO X M, et al. MiR-24 functions as a tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma through targeting FSCN1 [J]. *Journal of Experimental & Clinical*
- Cancer Research, 2015, 34: 1-9.
- [3] LIU R, ZHANG H, WANG X, et al. The mir-24-Bim pathway promotes tumor growth and angiogenesis in pancreatic carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (41): 43831-43842.
- [4] VOLINIA S, CALIN G A, LIU C G, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (7): 2257-2261.
- [5] TUT V M, BRAITHWAITE K L, ANGUS B, et al. Cyclin D1 expression in transitional cell carcinoma of the bladder; correlation with p53, wsf1, pRb and Ki67 [J]. *Br J Cancer*, 2001, 84 (2): 270.
- [6] SHOU Y, WANG X, CHEN C, et al. Exosomal miR-301a-3p from esophageal squamous cell carcinoma cells promotes angiogenesis by inducing M2 polarization of macrophages via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22 (1): 153.
- [7] HE T, SUN Y, ZHANG Y, et al. MicroRNA-200b and microRNA-200c are up-regulated in PCOS granulosa cell and inhibit KGN cell proliferation via targeting PTEN [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2019, 17 (1): 68.
- [8] 杨剑, 糜漫天. 细胞周期素 D1 与肿瘤研究进展 [J]. *国外医学(肿瘤学分册)*, 2003, 30 (5): 336-339.
- [9] KANYLMAZ G, YAVUZ B B, AKTAN M, et al. Prognostic importance of Ki-67 in breast cancer and its relationship with other prognostic factors [J]. *European Journal of Breast Health*, 2019, 15 (4): 256.
- [10] WONG A S T, GUMBINER B M. Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2003, 161 (6): 1191-1203.
- [11] IVASKA J. Vimentin: Central hub in EMT induction [J]. *Small GTPases*, 2011, 2 (1): 1436-1448.
- [12] HE H, LIN C, LU Y, et al. Knockdown of miR-24 Suppressed the tumor growth of cervical carcinoma through regulating PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Biochemical Genetics*, 2024, 62 (2): 1277-1290.

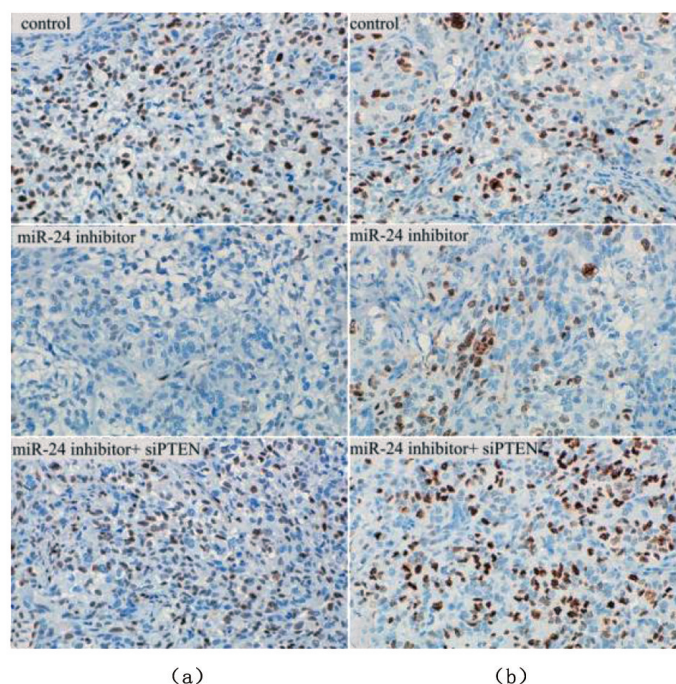
• 读者 • 作者 • 编者 •

医学论文中有关实验动物描述的要求

在医学论文的描述中,凡涉及实验动物者,在描述中应符合以下要求:(1)品种、品系描述清楚;(2)强调来源;(3)遗传背景;(4)微生物学质量;(5)明确体质量;(6)明确等级;(7)明确饲养环境和实验环境;(8)明确性别;(9)有无质量合格证;(10)有对饲养的描述(如饲料类型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求);(11)所有动物数量准确;(12)详细描述动物的健康状况;(13)对动物实验的处理方式有单独清楚的交代。

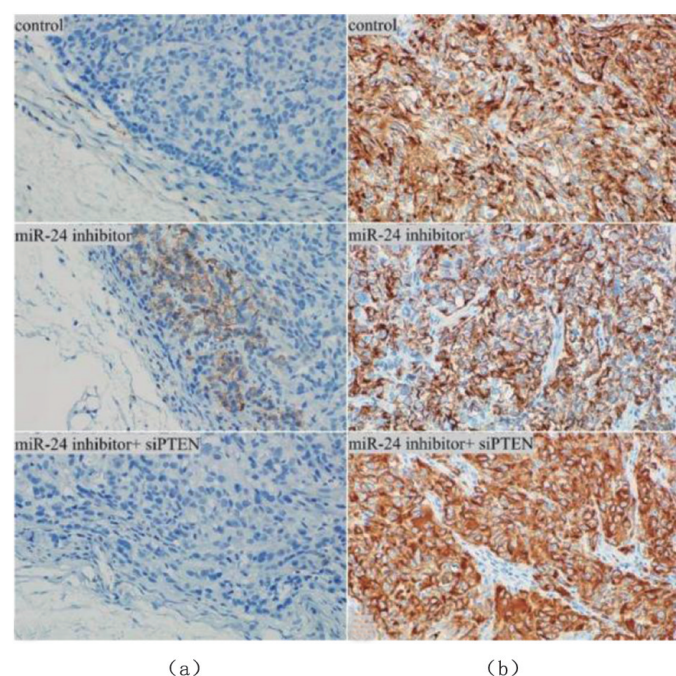
《福建医药杂志》编辑部

PTEN 抑制剂逆转靶向 microRNA-24 抑制宫颈癌 发生、发展的机制探索 (详见正文第 69 页)



注：(a) Cyclin D1 染色 (×200)；(b) Ki-67 染色 (×200) [上：对照组，中：miR-24 抑制剂组，下：miR-24 抑制剂+si-PTEN 组]。

图 1 PTEN 表达下调可逆转 miR-24 抑制剂对体内肿瘤细胞周期、增殖的影响



注：(a) E-cadherin 染色 (×200)；(b) Vimentin 染色 (×200) (上：对照组，中：miR-24 抑制剂组，下：miR-24 抑制剂+si-PTEN 组)。

图 2 PTEN 表达下调可逆转 miR-24 抑制剂对体内肿瘤 EMT 过程的影响