

miR-140-3p 靶向 ANK2 基因对子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其作用机制研究

惠雪莲,舒瑾,董鹏芸,赵娟

西安市中医院妇科,陕西 西安 710021

【摘要】目的 探讨微小RNA-140-3p (miR-140-3p)对子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响及作用机制。**方法** 选取于2016年2月至2018年9月在西安市中医院行手术治疗的59例子宫肌瘤患者为研究对象,同时期41例因子宫肌瘤切除全子宫的正常子宫肌组织作为对照,实时荧光定量PCR (RT-qPCR)检测组织中miR-140-3p和锚蛋白B (ANK2) mRNA表达水平。子宫肌瘤细胞分为miR-140-3p组(转染miR-140-3p模拟物mimics)、miR-NC组(转染mimics阴性对照序列)、si-ANK2组(转染ANK2小干扰RNA)、si-NC组(转染乱序无意义阴性序列)、miR-140-3p+pcDNA-ANK2组(共转染miR-140-3p mimics与ANK2过表达载体)和miR-140-3p+pcDNA组(共转染miR-140-3p mimics与空载体)。RT-qPCR和蛋白印迹(Western blot)分别检测miR-140-3p或ANK2蛋白水平验证转染效果,四甲基噻唑蓝染色法(MTT)检测各组细胞增殖情况,Transwell检测各组细胞的迁移和侵袭能力,Western blot检测各组细胞中细胞周期蛋白D1 (CyclinD1)、p21、基质金属蛋白酶2 (MMP-2)、E-钙黏附素(E-cadherin)蛋白表达。双荧光素酶报告基因实验验证子宫肌瘤细胞中miR-140-3p和ANK2调控关系。**结果** 与正常宫颈组织比较,子宫肌瘤组织中miR-140-3p表达水平降低[(0.38 ± 0.04) vs (1.06 ± 0.09)], ANK2 mRNA表达水平升高[(2.61 ± 0.24) vs (1.07 ± 0.10)],差异均具有统计学意义($P<0.05$);与miR-NC组比较,miR-140-3p组子宫肌瘤细胞存活率[(62.37 ± 1.59)% vs (99.63 ± 3.28)%]、迁移细胞数[(72.58 ± 8.19) vs (139.25 ± 12.34)]、侵袭细胞数[(53.91 ± 6.18) vs (115.21 ± 10.69)]、CyclinD1蛋白水平[(0.23 ± 0.04) vs (0.98 ± 0.11)]和MMP-2蛋白水平[(0.19 ± 0.03) vs (0.53 ± 0.06)]降低,而p21蛋白水平[(0.82 ± 0.08) vs (0.29 ± 0.05)]和E-cadherin蛋白水平[(0.57 ± 0.07) vs (0.21 ± 0.05)]升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$);与si-NC组比较,si-ANK2组子宫肌瘤细胞存活率[(72.59 ± 2.08)% vs (98.67 ± 3.58)%]、迁移细胞数[(75.69 ± 8.54) vs (142.58 ± 12.86)]、侵袭细胞数[(58.39 ± 6.58) vs (123.67 ± 11.24)]、CyclinD1蛋白水平[(0.39 ± 0.03) vs (0.68 ± 0.06)]和MMP-2蛋白水平[(0.21 ± 0.04) vs (0.59 ± 0.04)]降低,p21蛋白水平[(0.45 ± 0.07) vs (0.29 ± 0.05)]和E-cadherin蛋白水平[(0.43 ± 0.05) vs (0.19 ± 0.03)]升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$);与miR-140-3p+pcDNA组比较,miR-140-3p+pcDNA-ANK2组子宫肌瘤细胞存活率[(87.39 ± 3.02)% vs (61.23 ± 1.41)]、迁移细胞数[(146.28 ± 12.57) vs (75.49 ± 8.25)]、侵袭细胞数[(119.24 ± 11.08) vs (56.39 ± 6.24)]、CyclinD1蛋白水平[(0.58 ± 0.05) vs (0.21 ± 0.04)]和MMP-2蛋白水平[(0.48 ± 0.05) vs (0.22 ± 0.02)]升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),p21蛋白水平[(0.25 ± 0.04) vs (0.53 ± 0.06)]和E-cadherin蛋白水平[(0.34 ± 0.03) vs (0.56 ± 0.05)]降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 过表达miR-140-3p通过靶向下调ANK2表达抑制子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭。

【关键词】 子宫肌瘤;miR-140-3p;锚蛋白B;细胞增殖;迁移;侵袭

【中图分类号】 R737.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2020)05—0548—05

Effect of miR-140-3p targeting ANK2 gene on proliferation, migration, and invasion of uterine fibroid cells. HUI Xue-lian, SHU Jin, DONG Li-yun, ZHAO Juan. Department of Gynecology, Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710021, Shaanxi, CHINA

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of microRNA-140-3p (miR-140-3p) on the proliferation, mi-

通讯作者:董鹏芸,E-mail:563261699@qq.com

muscle cell calcification by up-regulating PI3K/Akt signaling and inhibiting apoptosis [J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0196232.

[15] 姜娟,孙宁玲.不同血压及代谢水平患者血浆CST变化的探讨[J].中华高血压杂志,2017,25(2): 200.

[16] 赵晓辉,高伟勤,杨军.心衰患者血浆CST和脑钠肽水平变化及其相关性[J].心血管康复医学杂志,2016,25(2): 145-147.

[17] 李洁,荆忱,刘义欣,等.CST在急性冠状动脉综合征患者中的检测价值[J].临床心血管病杂志,2016,32(6): 566-569.

[18] MUNTJEWERFF ELKE M, DUNKEL G, NICOLASEN MARA JT, et al. Catestatin as a target for treatment of inflammatory diseases [J].

Frontiers in immunology, 2018, 9: 2199.

[19] CHEN YJ, WANG XQ, YANG CD, et al. Decreased circulating catesstatin levels are associated with coronary artery disease: The emerging anti-inflammatory role [J]. Atherosclerosis, 2019, 28(1): 78-88.

[20] EISSA N, HUSSEIN H, MESGNA R, et al. Catestatin regulates epithelial cell dynamics to improve intestinal inflammation [J]. Vaccines (Basel), 2018, 6(4): pii: E67.

[21] 陈然,范小芳,郑青青,等.CST对间歇低氧高血压大鼠的影响及机制[J].中国病理生理杂志,2016,32(8): 1523-1524.

(收稿日期:2019-09-24)

gration, and invasion of uterine fibroid cells and its mechanism. **Methods** Fifty-nine patients with uterine fibroids who were surgically treated in Xi'an Traditional Chinese Medicine Hospital from February 2016 to September 2018 were selected as the research subjects, and 41 cases of normal uterine muscle tissue removed from the uterus during the same period were used as controls. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression levels of miR-140-3p and ankyrin B (ANK2) mRNA in tissues. Uterine fibroid cells are divided into miR-140-3p group (transfected with miR-140-3p mimics), miR-NC group (transfected with mimics negative control sequence), si-ANK2 group (transfected with ANK2 small interfering RNA), si-NC group (transfected with nonsense negative sequence), miR-140-3p+pcDNA-ANK2 group (co-transfected with miR-140-3p mimcs and ANK2 overexpression vector), and miR-140-3p+pcDNA group (co-transfected with miR-140-3p mimcs and empty vector). RT-qPCR and western blot were used to detect miR-140-3p or ANK2 protein levels to verify the transfection effect, and tetramethylthiazole blue staining (MTT) was used to detect the cell proliferation in each group. Transwell was used to detect the migration and invasion ability of cells in each group, and western blot was used to detect the expression levels of CyclinD1, p21, matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), and E-cadherin protein in each group. The dual luciferase reporter gene assay was used to verify the regulatory relationship between miR-140-3p and ANK2 in uterine fibroid cells. **Results** Compared with normal cervical tissues, the expression of miR-140-3p was decreased in uterine fibroids: (0.38 ± 0.04) vs (1.06 ± 0.09); the expression of ANK2 mRNA was increased: (2.61 ± 0.24) vs (1.07 ± 0.10); the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the miR-NC group, the survival rate of uterine fibroids in the miR-140-3p group, the number of migrating cells, the number of invading cells, CyclinD1 protein level, and MMP-2 protein level were all reduced: ($62.37 \pm 1.59\%$) vs ($99.63 \pm 3.28\%$), (72.58 ± 8.19) vs (139.25 ± 12.34), (53.91 ± 6.18) vs (115.21 ± 10.69), (0.23 ± 0.04) vs (0.98 ± 0.11), (0.19 ± 0.03) vs (0.53 ± 0.06); the differences were all statistically significant ($P < 0.05$). p21 protein level and E-cadherin protein level were both increased: (0.82 ± 0.08) vs (0.29 ± 0.05), (0.57 ± 0.07) vs (0.21 ± 0.05), and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the si-NC group, the survival rate of uterine fibroids in the si-ANK2 group, the number of migrating cells, and the number of invading cells, CyclinD1 protein level, and MMP-2 protein level were all reduced: ($72.59 \pm 2.08\%$) vs ($98.67 \pm 3.58\%$), (75.69 ± 8.54) vs (142.58 ± 12.86), (58.39 ± 6.58) vs (123.67 ± 11.24), (0.39 ± 0.03) vs (0.68 ± 0.06), (0.21 ± 0.04) vs (0.59 ± 0.04), and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). p21 protein level and E-cadherin protein level were both increased: (0.45 ± 0.07) vs (0.29 ± 0.05), (0.43 ± 0.05) vs (0.19 ± 0.03), and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the miR-140-3p+pcDNA group, the survival rate of uterine fibroids in the miR-140-3p+pcDNA-ANK2 group, the number of migrating cells, and the number of invading cells, CyclinD1 protein level, and MMP-2 protein level were all increased: ($87.39 \pm 3.02\%$) vs ($61.23 \pm 1.41\%$), (146.28 ± 12.57) vs (75.49 ± 8.25), (119.24 ± 11.08) vs (56.39 ± 6.24), (0.58 ± 0.05) vs (0.21 ± 0.04), (0.48 ± 0.05) vs (0.22 ± 0.02), and the differences were statistically significant; while p21 protein level and E-cadherin protein level were both decreased: (0.25 ± 0.04) vs (0.53 ± 0.06), (0.34 ± 0.03) vs (0.56 ± 0.05), and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of miR-140-3p inhibits proliferation, migration, and invasion of uterine fibroid cells by down-regulating ANK2 expression.

[Key words] Uterine fibroids; miR-140-3p; Ankyrin B; Cell proliferation; Migration; Invasion

子宫肌瘤是女性生殖器官常见的良性肿瘤,其病因与遗传、激素、子宫本身等多种因素有关^[1]。近年来,子宫肌瘤的发病率呈增长趋势^[2]。研究表明,子宫肌瘤细胞受到刺激后异常的增殖、迁移和侵袭是其发生发展的主要原因^[3],但关于细胞增殖、迁移和侵袭的机制未完全阐明,探究影响子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制,可为该疾病的治疗提供新途径。微小RNA (microRNA, miRNA)可在转录本后水平调控靶基因的表达,影响细胞的生长、凋亡、分化等生物学行为,在肿瘤的发生发展中起重要作用^[4]。研究显示,miR-140-3p在脊索瘤^[5]、非小细胞肺癌^[6]、哮喘^[7]等多种疾病中异常表达,可作为疾病诊治的靶点及预后判断标志物。目前,miR-140-3p在子宫肌瘤中表达及作用还未知。生物信息学软件预测显示,锚蛋白B (ankyrin-B, ANK2) 的 3' 非翻译区 (3' untranslated region, 3'UTR) 含有与 miR-140-3p 核苷酸序列结合的位

点,提示 ANK2 可能是 miR-140-3p 的靶基因。ANK2 属于细胞骨架蛋白家族成员,参与细胞增殖、运动、活化等多种细胞学行为,其过表达与肝癌^[8]、胃癌^[9]等肿瘤的发生发展密切相关,但 ANK2 对子宫肌瘤细胞生物学行为的影响还未知。本研究主要探讨了 miR-140-3p 对子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其是否通过调控 ANK2 表达发挥作用,以期为子宫肌瘤的靶向治疗提供新靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2016 年 2 月至 2018 年 9 月在西安市中医医院病理科证实为子宫肌瘤的 59 例手术切除标本为研究对象。患者年龄 29~55 岁,平均 (41.58 ± 6.12) 岁;病程 3~86 个月,平均 (29.67 ± 5.91) 个月。纳入标准:(1)病理类型为子宫肌瘤;(2)手术前未进行治疗。同时收集 41 例同时期因子宫肌瘤切除全子宫的正常子宫组织作为对照,患者年龄 31~53 岁,

平均(40.02 ± 6.35)岁;病程2~84个月,平均(29.29 ± 5.83)个月。手术切除后的宫颈组织置于无RNA酶的EP管中,放入液氮罐中保存备用。本研究经本院伦理委员会批准,患者自愿签署知情同意书。

1.2 细胞和实验试剂 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和RPMI 1640培养基(美国Gibco公司),胰蛋白酶和四甲基噻唑蓝(methylthiazoletrazolium, MTT)(美国Sigma公司),逆转录试剂盒和PCR试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司),Trizol试剂和LipofectamineTM 2000试剂盒(美国Invitrogen公司),PCR引物(上海生工生物工程有限公司),miR-140-3p模拟物(mimcs)及模拟阴性序列(miR-NC)、miR-140-3p抑制剂(anti-miR-140-3p组)及抑制剂阴性序列(anti-miR-NC)、ANK2的小干扰RNA(si-ANK2)及乱序无意义阴性序列(si-NC)、ANK2过表达载体(pcDNA-ANK2)及空载体(pcDNA)(上海吉凯基因公司),细胞周期蛋白D1(CyclinD1)和P21单克隆抗体(武汉博士德生物技术有限公司),基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)和E-钙黏附素(E-cadherin)多克隆抗体(美国Abcam公司),二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒和双荧光素酶活性检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 子宫肌瘤细胞培养 参照文献方法培养子宫肌瘤细胞^[10]。在无菌条件下,取约1 cm³子宫肌瘤组织置于培养皿,加入含双抗的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS),浸泡3~5 min后,漂洗3次。剪碎组织,加入适量浓度为0.2%的I型胶原酶,37℃消化2~3 h。完全培养基终止消化后,200目滤网过滤,收集滤液。1 000 r/min离心5 min,吸弃上清液,加入含10%FBS的RPMI 1640培养基,置于37℃、CO₂体积分数5%、湿度97%的培养箱中培养。根据细胞生长状况,及时更换新鲜培养基。待细胞融合至80%左右时,PBS清洗细胞,加入0.25%胰蛋白酶溶液消化,进行传代培养。

1.3.2 细胞转染和分组 对数生长期的子宫肌瘤细胞接种于6孔板中,每孔 1×10^5 个细胞。待细胞融合至60%时,参照LipofectamineTM 2000试剂盒操作说明,分别将miR-140-3p mimcs(miR-140-3p组)、miR-NC(miR-NC组)、anti-miR-140-3p(anti-miR-140-3p组)、anti-miR-NC(anti-miR-NC组)、si-ANK2(si-ANK2组)、si-NC(si-NC组)以及miR-140-3p mimcs与pcDNA-ANK(miR-140-3p+pcDNA-ANK2组)、miR-140-3p mimcs与pcDNA(miR-140-3p+pcDNA组)转染至细胞。转染48 h后,实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测miR-140-3p或蛋白印迹(Western blot)检测ANK2蛋白水平验证转染效果,并收集细胞用于后续实验。

· 550 ·

1.3.3 RT-qPCR检测miR-140-3p和ANK2 mRNA表达水平 Trizol试剂提取组织或细胞中总RNA,微量核酸仪检测RNA的纯度和浓度后,参照逆转录试剂盒说明书,将RNA逆转录为cDNA。然后以cDNA为模板进行扩增。扩增条件:95℃ 5 min, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共35个循环。miR-140-3p上游5'-ACACTCCAGCTGGGAGGCG-3',下游5'-CTCAA CTGGTGTGCGTGG-3';U6上游5'-CTCGCTTCGGCA GCACA-3',下游5'-AACGCTTCACGAATTGCGT-3';ANK2上游5'-GTAAGTCCGTAGTAACC GCG-3',下游5'-CCGACTGTGCCAAGCTGC-3';GAPDH上游5'-GCAATGCTGCTAACGT GCAGCT-3',下游5'-CTGAGTGTCCCAGACGTGCT-3'。miR-140-3p以U6为内参,ANK2以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-140-3p和ANK2 mRNA的相对表达水平。

1.3.4 MTT检测细胞增殖 转染后的各组细胞,调整浓度为 2.5×10^4 个/mL,每孔200 μL接种于96孔板中。每组设置3个复孔。培养箱中培养48 h后,每孔加入20 μL的MTT试剂(5 g/L),培养箱中继续孵育4 h。小心吸弃培养基,每孔加入150 μL二甲基亚砜,轻轻震荡混匀,酶标仪490 nm处测定吸光度值(absorbance, A)。以未转染的细胞作为对照组,计算各组细胞存活率。细胞存活率(%)= $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.3.5 Transwell检测细胞迁移和侵袭 转染后的各组细胞,调整浓度为 5×10^4 个/mL。细胞迁移实验:Transwell上室加入100 μL细胞悬液,下室加入500 μL含FBS的RPMI 1640培养基。培养48 h后,用4%多聚甲醛固定30 min,结晶紫染色15 min,倒置显微镜观察,随机选取5个视野,计数。细胞侵袭实验:将Matrigel基质胶用RPMI 1640培养基以1:8比例稀释,并铺于Transwell上室,自然晾干后100 μL细胞悬液,后续操作同细胞迁移实验。

1.3.6 Western blot法检测细胞中ANK2、CyclinD1、p21、MMP-2和E-cadherin蛋白水平 转染后的各组细胞,培养48 h后,收集细胞,PBS清洗两次。加入含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液,提取细胞中总蛋白,BCA法对蛋白进行定量。取适量蛋白溶液于沸水中煮沸5 min使其变性。然后以每孔30 μg蛋白行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,湿转至聚偏乙烯二氟膜。转膜后,置于5%脱脂牛奶中封闭2 h。分别加入稀释后的ANK2(1:800)、CyclinD1(1:400)、p21(1:400)、MMP-2(1:600)和E-cadherin(1:800)抗体,4℃孵育过夜。加入辣根过氧化酶标记的二抗IgG(1:200),室温孵育1 h。加入化学发光试剂ELC,避光显影,凝胶成像系统曝光拍照。Image J软件分析蛋白条带灰度值,以GAPDH为内参,目的蛋白与GAPDH条带灰度值的比值表示目的蛋白相对表达水平。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验验证miR-140-3p

与 ANK2 调控关系 生物信息学软件预测显示,ANK2 的 3'UTR 与 miR-140-3p 的核苷酸序列存在连续的结合位点。采用 PCR 技术扩增含 miR-140-3p 结合位点的 ANK2 的 3'UTR 序列,并将其插入荧光素酶报告质粒 psi CHECK-2 载体中,构建 ANK2 野生型质粒(WT-ANK2)。通过基因定点突变技术将结合位点突变后,插入 psi CHECK-2 载体,构建 ANK2 突变型质粒(MUT-ANK2)。分别将 WT-ANK2、MUT-ANK2 与 miR-140-3p mimic、miR-NC 共转染至子宫肌瘤细胞。转染 12 h 后,吸弃培养基,更换新鲜培养基。培养箱中继续培养至 48 h,0.25% 胰蛋白酶消化,收集细胞,检测荧光素酶活性,具体操作参照双荧光素酶活性检测试剂盒说明书,结果以荧光虫活性/海肾荧光强度比值表示各组的荧光素酶活性。

1.4 统计学方法 应用 SPSS22.0 软件对实验数据进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-q 检验。以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子宫肌瘤组织中 miR-140-3p 和 ANK2 mRNA 表达水平 与正常子宫肌组织比较,子宫肌瘤组织中 miR-140-3p 水平降低,ANK2 mRNA 水平升高,差异均具有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

表 1 子宫肌瘤组织中 miR-140-3p 和 ANK2 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	miR-140-3p	ANK2 mRNA
正常子宫肌组织	41	1.06±0.09	1.07±0.10
子宫肌瘤组织	59	0.38±0.04	2.61±0.24
<i>t</i> 值		51.283	38.768
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01

2.2 过表达 miR-140-3p 对子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响 与 miR-NC 组比较,miR-140-3p 组细胞中 miR-140-3p 水平升高,差异具有统计学意义(*P*<0.05),表明 miR-140-3p mimics 转染成功(*P*<0.05),细胞中 miR-140-3p 过表达。与 miR-NC 组比较,miR-140-3p 组细胞存活率、迁移和侵袭细胞数降低,CyclinD1 和 MMP-2 蛋白水平降低,p21 和 E-cadherin 蛋白水平升高,差异均具有统计学意义(*P*<0.05),见图 1、表 2 和表 3。

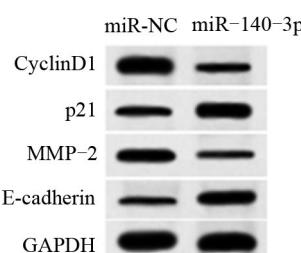


图 1 Western blot 法检测过表达 miR-140-3p 对子宫肌瘤细胞 CyclinD1、p21、MMP-2 和 E-cadherin 蛋白表达的影响

表 2 过表达 miR-140-3p 对子宫肌瘤细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	miR-140-3p	细胞存活率(%)	CyclinD1 蛋白	p21 蛋白
miR-NC	1.01±0.09	99.63±3.28	0.98±0.11	0.29±0.05
miR-140-3p	2.67±0.23	62.37±1.59	0.23±0.04	0.82±0.08
<i>t</i> 值	20.163	30.666	19.223	16.854
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 3 过表达 miR-140-3p 对子宫肌瘤细胞迁移和侵袭的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数	MMP-2 蛋白	E-cadherin 蛋白
miR-NC	139.25±12.34	115.21±10.69	0.53±0.06	0.21±0.05
miR-140-3p	72.58±8.19	53.91±6.18	0.19±0.03	0.57±0.07
<i>t</i> 值	13.505	14.893	15.205	12.555
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 抑制 ANK2 表达对子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响 与 si-NC 组比较,si-ANK2 组细胞中 ANK2 蛋白水平降低,差异具有统计学意义(*P*<0.05),表明 ANK2 小干扰 RNA 转染成功,细胞中 ANK2 表达受到抑制。与 si-NC 组比较,si-ANK2 组细胞存活率、迁移和侵袭细胞数降低,CyclinD1 和 MMP-2 蛋白水平降低,p21 和 E-cadherin 蛋白水平升高,差异均具有统计学意义(*P*<0.05),见图 2 和表 4 和表 5。

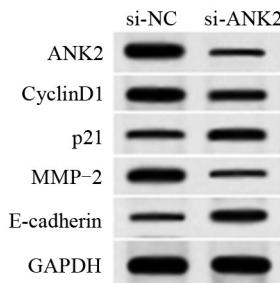


图 2 Western blot 法检测抑制 ANK2 表达对子宫肌瘤细胞 CyclinD1、p21、MMP-2 和 E-cadherin 蛋白表达的影响

表 4 抑制 ANK2 表达对子宫肌瘤细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	ANK2 蛋白	细胞存活率(%)	CyclinD1 蛋白	p21 蛋白
si-NC	0.72±0.08	98.67±3.58	0.68±0.06	0.29±0.05
si-ANK2	0.23±0.04	72.59±2.08	0.39±0.03	0.45±0.07
<i>t</i> 值	16.435	18.897	12.969	5.58
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 5 抑制 ANK2 表达对子宫肌瘤细胞迁移和侵袭的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数	MMP-2 蛋白	E-cadherin 蛋白
si-NC	142.58±12.86	123.67±11.24	0.59±0.04	0.19±0.03
si-ANK2	75.69±8.54	58.39±6.58	0.21±0.04	0.43±0.05
<i>t</i> 值	12.999	15.036	20.153	12.348
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.4 miR-140-3p 靶向调控 ANK2 表达 Target scan 生物信息学软件预测显示,ANK2 的 3'UTR 存在与 miR-140-3p 结合的核苷酸序列见图 3A。双荧光素酶活性检测试结果显示,miR-140-3p mimics 可降低 WT-ANK2 的荧光素酶活性(*P*<0.05),而对 MUT-ANK2 荧光素酶活性无显著影响(*P*>0.05),表明

miR-140-3p 可与 ANK2 的 3'UTR 靶向结合, 见表 6。miR-140-3p 组 ANK2 蛋白水平低于 miR-NC 组, anti-miR-140-3p 组 ANK2 蛋白水平高于 anti-miR-NC 组, 差异均有统计学意义($P<0.05$), 说明 miR-140-3p 在子宫肌瘤细胞中靶向负调控 ANK2 表达见图 3B 和表 7。

表 6 双荧光素酶活性检测结果($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	WT-ANK2	MUT-ANK2
miR-NC	1.06±0.08	1.02±0.06
miR-140-3p	0.43±0.03	0.97±0.05
t值	22.121	1.921
P值	<0.01	0.073

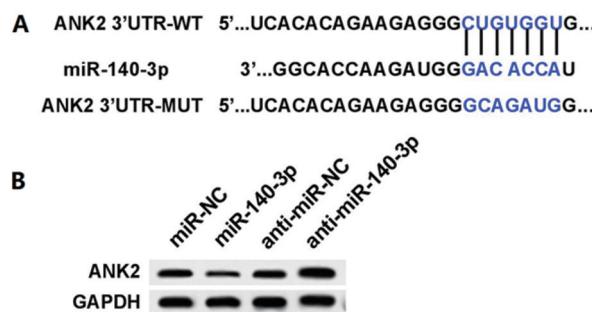


图 3 miR-140-3p 靶向调控 ANK2 表达

注:A, Target scan 软件预测 ANK2 的 3'UTR 存在与 miR-140-3p 结合的核苷酸序列;B, Western Blot 法检测 miR-140-3p 对 ANK2 蛋白表达的影响。

表 7 miR-140-3p 表达对 ANK2 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	ANK2 蛋白
miR-NC	0.51±0.06
miR-140-3p	0.25±0.04 ^a
anti-miR-NC	0.54±0.08
anti-miR-140-3p	1.02±0.09 ^b
F 值	188.223
P 值	<0.01

注:与 miR-NC 组比较,^a $P<0.05$;与 anti-miR-NC 组比较,^b $P<0.05$ 。

2.5 过表达 ANK2 逆转过表达 miR-140-3p 对子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响 与 miR-140-3+pcDNA 组比较, miR-140-3p+pcDNA-ANK2 组细胞存活率、迁移和侵袭细胞数升高, CyclinD1 和 MMP-2 蛋白水平升高, p21 和 E-cadherin 蛋白水平降低, 差异均具有统计学意义($P<0.05$), 见图 4、表 8 和表 9。

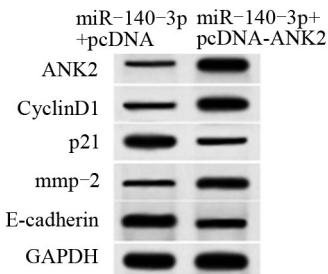


图 4 Western blot 检测过表达 ANK2 逆转 miR-140-3p 对子宫肌瘤细胞 CyclinD1、p21、MMP-2 和 E-cadherin 蛋白表达的影响

表 8 过表达 ANK2 逆转过表达 miR-140-3p 对子宫肌瘤细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	ANK2 蛋白	细胞存活率(%)	CyclinD1 蛋白	p21 蛋白
miR-140-3p+pcDNA	0.15±0.02	61.23±1.41	0.21±0.04	0.53±0.06
miR-140-3p+pcDNA-ANK2	0.58±0.06	87.39±3.02	0.58±0.05	0.25±0.04
t值	20.397	23.547	17.355	11.649
P值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 9 过表达 ANK2 逆转过表达 miR-140-3p 对子宫肌瘤细胞迁移和侵袭的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数	MMP-2 蛋白	E-cadherin 蛋白
miR-140-3p+pcDNA	75.49±8.25	56.39±6.24	0.22±0.02	0.56±0.05
miR-140-3p+pcDNA-ANK2	146.28±12.57	119.24±11.08	0.48±0.05	0.34±0.03
t值	14.125	14.827	14.484	11.319
P值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

miRNA 是一类小分子单链非编码 RNA, 长度为 18~25 个核苷酸, 其通过与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合, 抑制靶 mRNA 翻译或降解靶 mRNA, 进而调控靶基因的表达, 参与肿瘤的发生发展。miR-140-3p 是近年来新发现的一种 miRNA, 其在多种肿瘤中表达降低, 发挥抗肿瘤作用。如 DONG 等^[11]研究显示, miR-140-3p 过表达可抑制非小细胞肺癌细胞的生长、迁移和侵袭, 并诱导细胞凋亡。SUN 等^[12]研究显示, miR-140-3p 在乳腺癌细胞中表达降低, 过表达 miR-140-3p 抑制了乳腺癌细胞的增殖, 促进细胞凋亡。目前, miR-140-3p 对子宫肌瘤细胞增殖、迁移和

侵袭的影响还未知。

本研究显示, miR-140-3p 在子宫肌瘤组织中表达降低, 提示 miR-140-3p 可能参与子宫肌瘤的发生发展。过表达 miR-140-3p 后, 子宫肌瘤细胞存活率及迁移和侵袭细胞数降低, 提示 miR-140-3p 过表达可抑制子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭。CyclinD1 是细胞周期调控蛋白之一, 可促进细胞由 G₁ 期向 S 期转变, 加速细胞增殖^[13]。p21 是肿瘤抑制因子, 其表达增加可抑制细胞增殖。本研究显示, miR-140-3p 过表达可降低子宫肌瘤细胞中 CyclinD1 蛋白水平, 提高 p21 蛋白水平, 提示过表达 miR-140-3p 通过调控 CyclinD1 和 p21 蛋白表达抑制子宫肌瘤细胞增殖。基质

金属蛋白酶参与降解细胞外基质和基底膜,促进细胞迁移和侵袭。E-cadherin 是钙黏附蛋白家族成员,其表达下调或丧失可导致细胞间黏附降低,易于脱落,进而迁移和侵袭^[14]。本研究显示,miR-140-3p 过表达可降低子宫肌瘤细胞中 MMP-2 蛋白水平,提高 E-cadherin 蛋白水平,提示过表达 miR-140-3p 通过调控 MMP-2 和 E-cadherin 蛋白表达抑制子宫肌瘤细胞迁移和侵袭。

为了进一步探讨过表达 miR-140-3p 抑制子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制,本研究通过生物信息学软件预测显示,ANK2 可能是 miR-140-3p 的靶基因,并通过双荧光素酶报告基因实验证实了 miR-140-3p 在子宫肌瘤细胞中靶向负调控 ANK2 表达。ANK2 是锚蛋白家族成员之一,参与肿瘤发生和发展过程。CHEN 等^[15]研究显示,胰腺癌中 ANK2 表达升高,沉默 ANK2 降低了胰腺肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力,ANK2 是治疗胰腺癌的潜在靶标。王翠艳等^[16]研究显示,沉默 ANK2 可抑制胃癌细胞 SGC-7901 增殖和转移,阻滞细胞周期进程。目前,ANK2 对子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响还未知。

本研究显示,子宫肌瘤组织中 ANK2 mRNA 水平表达升高,与相关研究结果一致^[8],提示 ANK2 也参与子宫肌瘤的发生发展。通过转染 ANK2 小干扰 RNA 至子宫肌瘤细胞,结果显示,抑制 ANK2 表达可降低子宫肌瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力,说明抑制 ANK2 表达可降低子宫肌瘤的发展进程,提示 ANK2 可能是子宫肌瘤治疗的分子靶点。此外,本研究还显示,过表达 ANK2 逆转了过表达 miR-140-3p 对子宫肌瘤细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用,提示 miR-140-3p 通过下调 ANK2 表达抑制子宫肌瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。

综上所述,miR-140-3p 在子宫肌瘤组织中表达降低,过表达 miR-140-3p 可抑制子宫肌瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力,其作用机制与下调 ANK2 表达有关,miR-140-3p/ANK2 轴可能为子宫肌瘤的靶向分子治疗提供了潜在靶点。

参考文献

- [1] YANG Y, HAO YL, ZHANG J, et al. Ultrasound-guided percutaneous microwave ablation for subserosal uterine myomas [J]. J Minim Invasive Gynecol, 2019, 26(3): 544-550.
- [2] 冀改梅. 剖宫产术中同时行子宫肌瘤剔除术 74 例分析[J]. 医药前沿, 2015, 5(15): 122-123.
- [3] 韩永贵, 孙长冬. 子宫肌瘤组织中肌球蛋白轻链激酶和硫酸基转移酶 2A1 表达量与细胞侵袭、上皮间质转化的相关性[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(15): 3535-3538.
- [4] LU S, WANG MS, CHEN PJ, et al. miRNA 186 inhibits prostate cancer cell proliferation and tumor growth by targeting YY1 and CDK6 [J]. Exp Ther Med, 2017, 13(6): 3309-3314.
- [5] WANG XB. Identification of miR-140-3p as a marker associated with poor prognosis in spinal chordoma [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(8): 4877-4885.
- [6] 张宇轩, 李春伟, 毛文浩, 等. miR-140-3p 通过靶向 PD-L1 抑制非小细胞肺癌 A549 细胞的活力、迁移和侵袭[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(1): 14-20.
- [7] JUDE JA, DILEEPAN M, SUBRAMANIAN S, et al. miR-140-3p regulation of TNF- α -induced CD38 expression in human airway smooth muscle cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 303(5): L460-L468.
- [8] 宋浩, 刘志苏. 锚蛋白 B 在肝癌组织中表达失衡并影响患者预后 [J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(3): 396-398.
- [9] CAO WL, WEI WY, ZHAN ZX, et al. Regulation of drug resistance and metastasis of gastric cancer cells via the microRNA647-ANK2 axis [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 1958-1966.
- [10] 封全灵, 熊祯祯, 王智霆, 等. 米非司酮对孕激素受体 M 阳性子宫肌瘤细胞增殖、凋亡的影响[J]. 山东医药, 2017, 57(3): 13-15.
- [11] DONG W, YAO C, TENG X, et al. MiR-140-3p suppressed cell growth and invasion by downregulating the expression of ATP8A1 in non-small cell lung cancer [J]. Tumor Biol, 2016, 37(3): 2973-2985.
- [12] SUN T, SONG Y, YU H, et al. Identification of lncRNA TRPM2-AS/miR-140-3p/PYCR1 axis's proliferates and anti-apoptotic effect on breast cancer using co-expression network analysis [J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(6): 760-773.
- [13] LIN SR, YEH HC, WANG WJ, et al. MiR-193b mediates CEBPD-induced cisplatin sensitization through targeting ETS1 and Cyclin D1 in human urothelial carcinoma Cells [J]. J Cell Biochem, 2017, 118(6): 1563-1573.
- [14] QIU Y, LIU Y, LI WH, et al. P2Y2 receptor promotes the migration and invasion of breast cancer cells via EMT-related genes Snail and E-cadherin [J]. Oncol Rep, 2018, 39(1): 138-150.
- [15] CHEN Y, LÖHR M, JESNOWSKI R. Inhibition of ankyrin-B expression reduces growth and invasion of human pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Pancreatology, 2010, 10(5): 586-596.
- [16] 王翠艳, 王志伟. 沉默 ANK2 基因表达对胃癌细胞增殖、周期以及转移能力的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2018, 27(3): 325-328.

(收稿日期:2019-11-14)