

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.10.012

miRNA-21siRNA 对宫颈癌 HeLa 细胞周期及细胞凋亡的影响*

徐文莉, 廖长征, 罗 艺, 林燕华, 张洪德

(深圳市龙岗中心医院中心实验室, 广东深圳 518116)

摘 要:目的 探讨 microRNA-21 (miR-21) siRNA 对宫颈癌 HeLa 细胞周期和细胞凋亡的影响。方法 实时荧光定量 PCR 检测 HeLa 细胞转染后 siRNA 干扰组及阴性对照组中 miR-21 的表达量。流式细胞仪分析 HeLa 细胞周期及凋亡率的变化。结果 转染 siRNA 干扰载体后, 实时荧光定量 PCR 检测 HeLa 细胞中 miR-21 明显低于空白对照组及阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 空白对照组与阴性对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); siRNA 表达载体可明显增加细胞凋亡率, 并显现出 G_0/G_1 期阻滞作用。结论 miR-21siRNA 干扰载体可以高效地抑制宫颈癌 HeLa 细胞 miR-21 基因的表达, 增强细胞的凋亡, 并使细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期。

关键词: 宫颈癌; 细胞周期; 细胞凋亡; microRNA-21

中图法分类号: R737.33

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)10-1355-03

Influence of miRNA-21siRNA on cervical cancer HeLa cell cycle and apoptosis*

XU Wenli, LIAO Changzheng, LUO Yi, LIN Yanhua, ZHANG Hongde

(Central Laboratory, Longgang Center Hospital, Shenzhen, Guangdong 518116, China)

Abstract: Objective To detect the influence miRNA-21siRNA on cell cycle and apoptosis of cervical cancer HeLa cell. **Methods** Real time fluorescence quantitative PCR (Real-PCR) was used to detect the expression of miRNA-21 in HeLa cells after siRNA transfection and negative control group. Apoptosis and cell cycle of HeLa cells were analyzed by flow cytometry. **Results** The relative level of miRNA-21 in HeLa cells after siRNA transfection was significantly lower than that in blank control group and negative control group by Real-PCR ($P < 0.05$), but there was no different between blank control group and negative control group ($P > 0.05$). The apoptosis rate of the siRNA group was all higher than that in the blank control group and the negative control group, and the cells were blocked at the G_0/G_1 phase. **Conclusion** miRNA-21siRNA interference carrier could effectively inhibit the expression of miRNA-21 gene in cervical cancer HeLa cells, enhance cell apoptosis, and block cell cycle in G_0/G_1 phase.

Key words: cervical cancer; cell cycle; cell apoptosis; microRNA-21

我国宫颈癌发病例数居全球第二位^[1], 在我国女性生殖系统肿瘤中居首位^[2], 其发病是一个多因素参与的复杂过程。肿瘤细胞的侵袭、转移是促使宫颈癌病情进展、死亡的主要原因之一。研究表明 microRNA-21(miR-21)是宫颈癌细胞增殖、侵袭及迁移过程中重要的调控因子, 是宫颈癌基因治疗的重要靶点之一^[3-4]。RNA 干扰技术是近几年发展起来的一种基因封闭技术, 可以特异性剔除或关闭特定基因的表达, 本项目拟合成 siRNA, 构建合成 miR-21-siRNA 干扰载体, 靶向抑制宫颈癌 HeLa 细胞 miR-21 的表达, 观察 miR-21-siRNA 对宫颈癌 HeLa 细胞生长的影响。

1 材料与方**1.1 材料** 人宫颈癌亲本细胞株 HeLa 购自中科院

上海生化细胞所细胞库, 总 RNA 提取试剂盒购自杭州博日科技有限公司, miR-21-siRNA、阴性对照及 U6 引物购自广州锐博生物科技有限公司, PI 及 ANEXIN-FITC Apop Detector kit 试剂盒购自美国 BD 公司, 新生牛血清购自美国 Gibco 公司, 细胞培养瓶及培养板购自美国 Corning 公司。仪器: CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司, 离心机购自德国 Eppendorf 公司, FACSCanto 流式细胞仪购自美国 BD 公司, VIIA7 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.2 方法**1.2.1 细胞培养及转染** HeLa 细胞于培养基中培养、消化及传代, siRNA 及阴性对照转染 HeLa 细胞, 作为 siRNA 干扰组和阴性对照组。**1.2.2 实时荧光定量 PCR** 转染 72 h 后, 按照试剂

* 基金项目: 广东省深圳市龙岗区经济与科技发展专项资金医疗卫生科技计划项目(201620441)。

作者简介: 徐文莉, 女, 副主任技师, 主要从事肿瘤分子诊断方向研究。

说明书进行操作,提取总 RNA, Multiskan go 酶标分析仪检测 RNA 纯度及浓度, A_{260}/A_{280} 吸光度比值为 1.8~2.0 时满足要求。以 U6 作为内参, 反转录引物为 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'。反应条件: 95 °C, 5 min; 40 个 PCR 循环 [95 °C, 10 s; 60 °C, 20 s; 72 °C, 20 s; 78 °C, 20 s (收集荧光)]; 为了建立 PCR 产物的熔解曲线, 扩增反应结束后继续从 72 °C 缓慢加热到 99 °C (每 5 s 升高 1 °C)。miR-21 5'-TGC GTG TCG TGG AGT C-3', 反应条件: 95 °C, 5 min; 40 个 PCR 循环 [95 °C, 10 s; 60 °C, 20 s; 72 °C, 20 s; 78 °C, 20 s (收集荧光)]。为了建立 PCR 产物的熔解曲线, 扩增反应结束后继续从 72 °C 缓慢加热到 99 °C (每 5 s 升高 1 °C)。以 U6 为内参, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示相对表达量, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{siRNA干扰组} - Ct_{U6}) - (Ct_{siRNA干扰组} - Ct_{U6})_{阴性对照组}$, Ct 为每个反应管中的荧光信号达到所设定阈值时所经历的循环数。

1.2.3 碘化丙啶(PI)法检测肿瘤细胞周期 胰酶消化细胞后, 收集细胞悬液离心, 弃去上清液, 用 PBS 洗涤 2 次, 调整细胞水平在 1×10^5 个/mL 左右, 加入 PI, 室温避光 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.4 流式细胞术检测肿瘤细胞的凋亡 细胞悬液

处理同 1.2.3 步骤, 取 100 μ L 细胞悬液、7-AAD 5 μ L 及 FITC ANNEXIN V 5 μ L 充分混匀, 置于室温 (20~25 °C) 避光 15 min, 加 400 μ L Binding Buffer 在 1 h 内进行检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

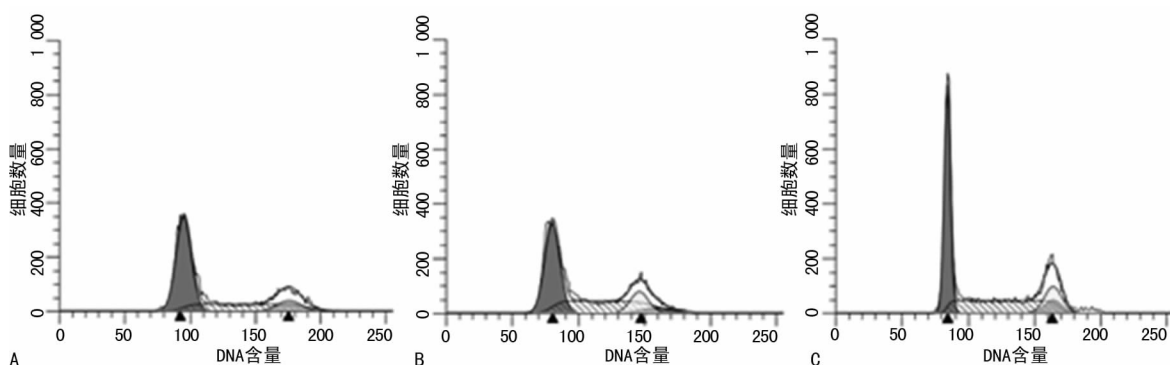
2 结果

2.1 miR-21 在不同细胞系中的表达 细胞转染后 miR-21 的表达, 结果显示 siRNA 干扰组表达量为 0.245 ± 0.012 , 均明显低于阴性对照组的 0.912 ± 0.015 及空白对照组的 1.000, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 空白对照组与阴性对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 转染后各组细胞的周期变化 ($\bar{x} \pm s, \%$)

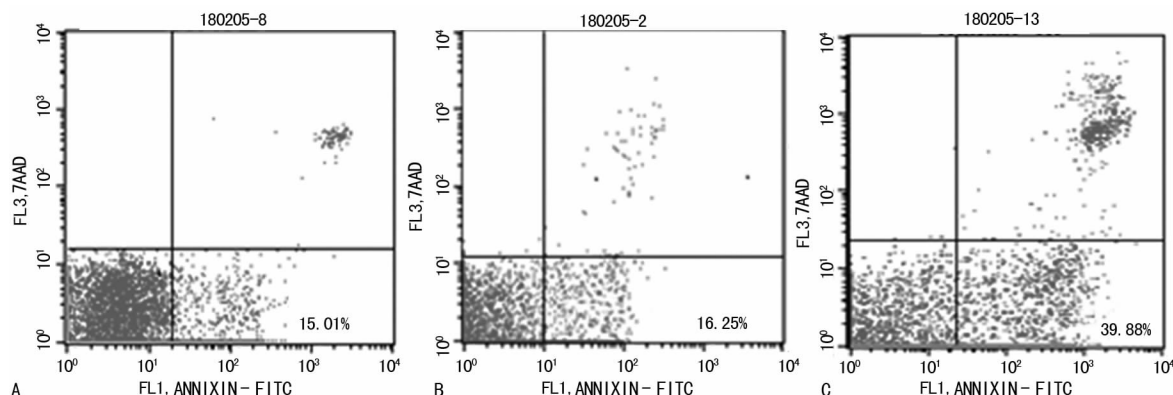
组别	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
空白对照组	38.22±1.12	40.28±3.59	21.45±1.92
阴性对照组	39.87±1.26	37.15±2.19	22.68±2.97
siRNA 干扰组	65.08±2.25* #	22.56±2.45* #	12.01±1.27* #

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较, # $P < 0.05$



注: A 为空白对照组; B 为阴性对照组; C 为 siRNA 干扰组

图 1 各组细胞周期的流式细胞图



注: A 为空白对照组; B 为阴性对照组; C 为 siRNA 干扰组

图 2 各组细胞凋亡率的流式细胞图

2.2 流式细胞术分析细胞周期的变化 采用 PI 单染法检测细胞周期, siRNA 干扰的 G₀/G₁ 期细胞比

例明显升高, S 期及 G₂/M 期细胞比例明显下降, 与空白对照组及阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。阴性对照组与空白对照组相比, 不同细胞周期期间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1 和图 1。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 流式细胞仪 AN-NIXIN V/7AAD 双染法检测结果显示, 空白对照组、阴性对照组、siRNA 干扰组凋亡率分别为 (15.25 ± 0.42)%、(16.87 ± 0.15)%、(40.14 ± 2.58)%。siRNA 转染 HeLa 细胞后, 细胞凋亡率明显升高, 与空白对照组及阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 空白对照组与阴性对照组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

3 讨 论

宫颈癌是全球最为常见的妇科恶性肿瘤之一, 目前研究证明高危型人乳头瘤病毒与宫颈癌具有密切关系, 但不是感染了该病毒的患者一定发展为宫颈癌, 从而说明宫颈癌的发生、发展还有其他因素的参与。研究证实 miRNAs 调控肿瘤的发生、发展, miR-21 是体内重要的 miRNAs 之一, 通过靶向调控多种细胞凋亡相关基因, 促进细胞增殖, 对抗细胞凋亡, 参与多种肿瘤的发生、发展和侵袭、转移过程, 如胃癌、神经胶质细胞瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌等^[5-8]。研究证实, miR-21 通过促进宫颈癌肿瘤细胞的侵袭、转移参与宫颈癌的发生、发展^[3]。鉴于 miR-21 在恶性肿瘤细胞中生物学行为的调控作用, 通过改变 miR-21 的表达量对调控宫颈癌的发生、发展具有重要的作用。

siRNA 源于双链 RNA(dsRNA), dsRNA 在细胞质中由 Dicer 酶复合物切割成 21~23 nt 左右的小片段, 即 siRNA, 最早在植物中被发现, 后来 FIRE 等^[9]发现 siRNA 能有效地抑制线虫基因的表达。siRNA 经内涵体进入细胞中, 通过内涵体释放后双链被切开, 反义链 RNA 与相关蛋白质结合形成 RNA 诱导的沉默复合体, 其复合体识别靶基因的信使 RNA, 并使其降解, 从而使特定蛋白的表达受到抑制, 导致相关基因沉默。siRNA 可以通过人工合成, 其序列可以设计成能够抑制任何相关靶基因的序列。基于该理论, 本研究设计了 miR-21 特异性的干扰载体, 研究对宫颈癌 HeLa 细胞的影响。

本研究利用构建成功的 miR-21siRNA 表达载体转染宫颈癌 HeLa 细胞, 观察干扰载体对 HeLa 细胞周期的影响。研究结果显示, siRNA 干扰载体明显提高了 HeLa 细胞 DNA 在 G₀/G₁ 期的水平; 并明显增加

了 HeLa 细胞凋亡。原因可能在于细胞周期包括 G₀/G₁ 期、S 期、G₂ 期、M 期 4 个时相, 每个时期异常都会影响 DNA 的合成, 本研究中细胞 DNA 合成阻滞于 G₀/G₁ 期, 失去分裂能力, 终生处于 G₀/G₁ 期, 诱导细胞的凋亡。

综上所述, miR-21siRNA 表达载体可以有效地抑制宫颈癌 HeLa 细胞中 miR-21 的表达, 促进 HeLa 细胞的凋亡, 有效地抑制肿瘤细胞的增殖, 为将来进一步肿瘤生物治疗提供基础, 为新型抗癌药物的开发提供了新的策略和思路。

参考文献

- [1] CHEN W Q, ZHENG R H, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [2] 国家基本药物临床应用指南和处方集编委会. 国家基本药物临床应用指南(2012年版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2013:346-348.
- [3] XU L, XU Q, LI X W, et al. MicroRNA-21 regulates the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells via tumor necrosis factor- α [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4):4659-4663.
- [4] XU J J, ZHANG W, LV Q Y, et al. Overexpression of miR-21 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells via the inhibition of PTEN[J]. Oncol Rep, 2015, 33(6):3108-3116.
- [5] CHEN J, ZHOU C, LI J H, et al. miR-21-5p confers doxorubicin resistance in gastric cancer cells by targeting PTEN and TIMP3[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4):1855-1866.
- [6] WANG G B, LIU J H, HU J, et al. MiR-21 enhanced glioma cells resistance to carmustine via decreasing Spry2 expression[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(22):5065-5071.
- [7] SHEN H, ZHU F, LIU J Y, et al. Alteration in Mir-21/PTEN expression modulates gefitinib resistance in non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2014, 9(7):e103305.
- [8] YEUNG C L A, NGAI-NA C, TSURUGA T, et al. Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1[J]. Nat Commun, 2016, 7:11150-11156.
- [9] FIRE A, XU S Q, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391(6669):806-811.