

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.005

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.005>

## miR-128-3p 在宫颈癌中的表达及其发病机制

张华东，张显峰，刘桂琴，闫晓歌

(平顶山市第五人民医院病理科，河南 平顶山 467000)

**[摘要]** 目的：研究miR-128-3p在宫颈癌(cervical carcinoma, CC)组织及癌旁组织中的表达差异，并进一步探索其在CC发病中的机制。方法：收集于平顶山市第五人民医院就诊的CC患者癌组织标本，采用荧光素酶报告基因检测HEK293细胞株中miR-128-3p与BMI1靶向关系，Western印迹法验证miR-128-3p BMI1蛋白的表达水平，实时荧光定量PCR(real-time quantitation PCR, RT-qPCR)法检测CC组织及癌旁组织中miR-128-3p及BMI1的相对表达含量，流式细胞术法检测miR-128-3p过表达后HeLa细胞凋亡情况。结果：miR-128-3p靶向结合于BMI1的3'UTR区；miR-128-3p在CC中低表达，BMI1在CC中高表达；miR-128-3p过表达下调BMI1表达，并促进HeLa细胞凋亡。结论：miR-128-3p在CC患者中低表达，可能通过靶向BMI1发挥其生物学效应，并促进HeLa细胞凋亡。

**[关键词]** miR-128-3p；宫颈癌；BMI1

## Expression of miR-128-3p in cervical cancer and its pathogenesis

ZHANG Huadong, ZHANG Xianfeng, LIU Guiqin, YAN Xiaoge

(Department of Pathology, Fifth People's Hospital of Pingdingshan, Pingdingshan Henan 467000, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the differential expression of miR-128-3p in cervical carcinoma (CC) tissue and paracancerous tissue, and to explore its pathogenic role in CC. **Methods:** The specimens of CC patients were collected in the Fifth People's Hospital of Pingdingshan. Luciferase reporter gene assay was used to explore targeting regulatory relations between miR-128-3p and BMI1 in HEK293. Western blot was employed to verify the expression of BMI1 protein, the potential target of miR-128-3p. Real-time quantitation PCR (RT-qPCR) was conducted to detect the relative expression of miR-128-3p and BMI1 in CC tissue and paracancerous tissue. Flow cytometry experiment was performed to detect apoptosis of HeLa cells after overexpression of miR-128-3p. **Results:** miR-128-3p targeted the 3'UTR region of BMI1. Low expression of miR-128-3p was found, while high expression of BMI1 found in CC. Overexpression of miR-128-3p down-regulated the expression of BMI1, and promoted the apoptosis of HeLa cells. **Conclusion:** MiR-128-3p is low expressed in CC patients and may bring biological effects by targeting BMI1. miR-128-3p promotes the apoptosis of HeLa cells.

**Keywords** miR-128-3p; cervical cancer; BMI1

收稿日期 (Date of reception): 2018-04-28

通信作者 (Corresponding author): 张显峰, Email: 13837599281@163.com

宫颈癌(cervical carcinoma, CC)是常见的妇科恶性肿瘤之一，在我国女性恶性肿瘤发病率中居第2位，仅次于乳腺癌，病死率约为2.86/10万<sup>[1]</sup>。患者发病年龄多为40~60岁，但近年来CC的发病年龄呈年轻化趋势<sup>[2]</sup>。

miRNA是一类长19~25 nt的非编码小RNA，通过抑制翻译或降解mRNA转录本的方式，从转录及转录后水平调控靶基因的表达<sup>[3]</sup>。miRNA参与调节细胞的多种生物学功能，包括细胞增殖、分化、凋亡、迁移、侵袭等，并在肿瘤的发生、发展中起重要作用<sup>[4]</sup>。miRNA的差异表达可对多种肿瘤的诊断及预后判断起提示作用，并可作为生物标志物发挥作用。

随着研究的进展，miRNA在CC中的重要作用也逐渐被认知。miRNA的异常表达对CC患者具有辅助诊断、判断预后及指导治疗的作用，例如miR-20a在CC患者中上调，通过靶向程序性细胞凋亡蛋白6(programmed cell death 6, PDCD6)在CC细胞中发挥促生长作用<sup>[5]</sup>；miR-187通过靶向Bcl-2，可诱导SiHa细胞凋亡<sup>[6]</sup>；miR-15b在CC患者中高表达，并提示较差的预后<sup>[6]</sup>；此外，miR-15a还可提高CC患者对喜树碱的化疗敏感性<sup>[7]</sup>。因此，本研究旨在探索miR-128-3p在CC发病中的机制，以期为CC的诊断及治疗提供新思路。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

收集于2015年5月至2017年9月在平顶山市第五人民医院就诊的52例CC患者作为研究对象，中位年龄42岁。诊断依据参考《宫颈癌及癌前病变规范化诊疗指南》<sup>[8]</sup>，均活检取材经病理学确诊。根据2009年国际妇产科联合会外阴癌分期标准(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)<sup>[9]</sup>，患者均存在可测量病灶并进行分期，包括I期4例，II期11例，III期34例，IV期3例。患者未经任何放射治疗(以下简称放疗)、化学治疗(以下简称化疗)，合并其他恶性肿瘤患者除外。所有新鲜组织在手术切除后立即取样，包括癌组织及癌旁组织(离病灶大于5 cm)，然后立即于液氮中冻存。本研究经平顶山市第五人民医院伦理委员会审核批准，患者均签署知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

HeLa细胞株及人胚肾细胞株HEK293购于上海

生命科学研究院细胞库，常规培养于DMEM培养基(含10%FBS, 100 μg/mL链霉素及100 U/mL青霉素)，在37 °C, 5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度的条件下进行培养，取对数期细胞进行后续实验。

#### 1.2.2 荧光素酶报告基因检测

应用miR-128-3p模拟物及BMI1 3'UTR荧光素酶载体对HEK293细胞进行共转染。以阴性控制(negative control, NC)及空载体为对照，转染24 h后进行荧光素酶检测，参照美国Promega公司萤光素酶检测系统。miR-128-3p模拟物由上海吉玛制药技术有限公司合成，BMI1 3'UTR荧光素酶载体由广州赛业生物科技有限公司构建。

#### 1.2.3 实时荧光定量PCR检测

即时取患者及健康对照CC组织样本于液氮中保存。实验前采用超声震荡仪获得单个细胞悬液，然后采用TRIzol-氯仿方法提取细胞总RNA，最后采用Oligo dT法进行反转录反应，以管家基因U6及GAPDH为内参，同时进行miR-128-3p, BMI1, U6及GAPDH的实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)反应，反应设置3个复孔，得出C<sub>t</sub>均值，以正常人为对照，应用ΔΔC<sub>t</sub>相对定量法分析miR-128-3p及BMI1表达水平的差异。ΔΔC<sub>t</sub>=ΔC<sub>t</sub>实验组-ΔC<sub>t</sub>对照组，ΔC<sub>t</sub>=C<sub>t</sub>目的基因-C<sub>t</sub>管家基因，2<sup>-ΔΔCt</sup>即为基因表达差异的倍数。

序列如下：BMI1-F序列为5'-CTGGTTGCCCA-TTGACAGC-3'；BMI1-R序列为5'-CAGAAAATGA-ATGCGAGCCA-3'；miR-128-F1序列为5'-GTT-GGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA-CCAGAGCCAACAAAGAGAC-3'；miR-128-F2序列为5'-CGGC GGTCACAGTGAACCGGT-3'；miR-128-R2序列为5'-GTCAGGGTCCGAGGT-3'；U6-F序列为5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3'；U6-R序列为5'-AACGATTACGAATTGCGT-3'；GAPDH-F序列为5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'；GAPDH-R序列为5'-GGCATGGACTGTGGTCA-TGAG-3'。

#### 1.2.4 Western印迹检测

使用单去污裂解液提取HeLa细胞总蛋白，以考马斯亮蓝法进行定量。将煮沸变性后蛋白进行SDS-PAGE电泳，并低温转移到PVDF膜上。室温封闭膜后与BMI1抗体(1:1 000)和GAPDH内参抗体(1:5 000)进行一抗孵育过夜，相应的辣根过氧化物酶标记二抗孵育(1:5 000)1 h。最后以ECL发光法检测条带。

#### 1.2.5 细胞凋亡检测

采用DOJINDO细胞凋亡试剂盒(Annexin V FITC

apoptosis detection kit), 于转染第48 h检测细胞凋亡, 依照标准操作规程孵育抗体, 于Beckman FC500上机检测, 并以IgG同型抗体为对照优化实验条件。

### 1.3 统计学处理

应用SPSS 17.0统计软件进行数据分析。3次以上重复计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。计量资料均数比较采用独立样本t检验, 计数资料比较采用 $\chi^2$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-128-3p 靶向结合与 BMI1 的 3'-UTR 区

通过生物信息学方法(TargetScan, miRBase)预测到miR-128-3p种子区靶向结合与BMI1的3'UTR区, 并构建BMI1 3'UTR区的野生型(wtBMI1)及突变型载体(mutBMI1), 突变型载体于种子结合区特异性删除4个碱基。在与HEK293细胞株中共转染miR-128-3p 模拟物及BMI1表达载体时发现: miR-128-3p mimics可显著降低BMI1野生型载体荧光素酶活性( $P=0.013$ ), 而不降低突变型表达载体荧光素酶活性( $P=0.237$ , 图1)。

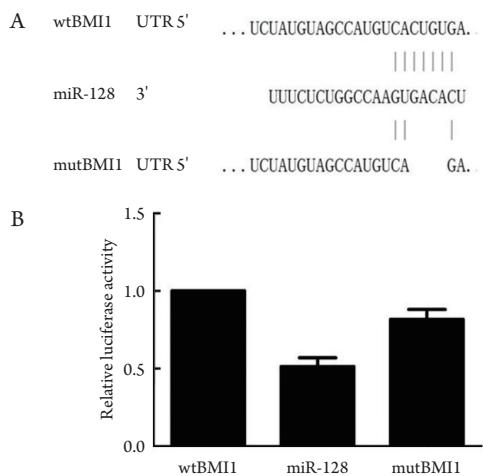


图1 miR-128靶向结合于BMI1的3'-UTR区

Figure 1 miR-128 targeted to 3'-UTR of BMI1

(A) miR-128靶向结合BMI1的3'-UTR区及突变型载体; (B) miR-128降低BMI1的3'-UTR荧光素酶活性。  
(A) miR-128 targets to 3'-UTR of BMI1 and the mutant vector; (B) miR-128 reduced BMI1 3'-UTR luciferase activities.

### 2.2 miR-128-3p 和 BMI1 在 CC 中的表达

相对于瘤旁组织, CC中miR-128-3p表达降低( $P=0.019$ ), 而BMI1表达升高( $P=0.037$ , 图2)。根

据临床分期及病理分型对CC患者进行统计发现: miR-128-3p在早期及晚期CC患者和鳞癌及非鳞癌患者之间的差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

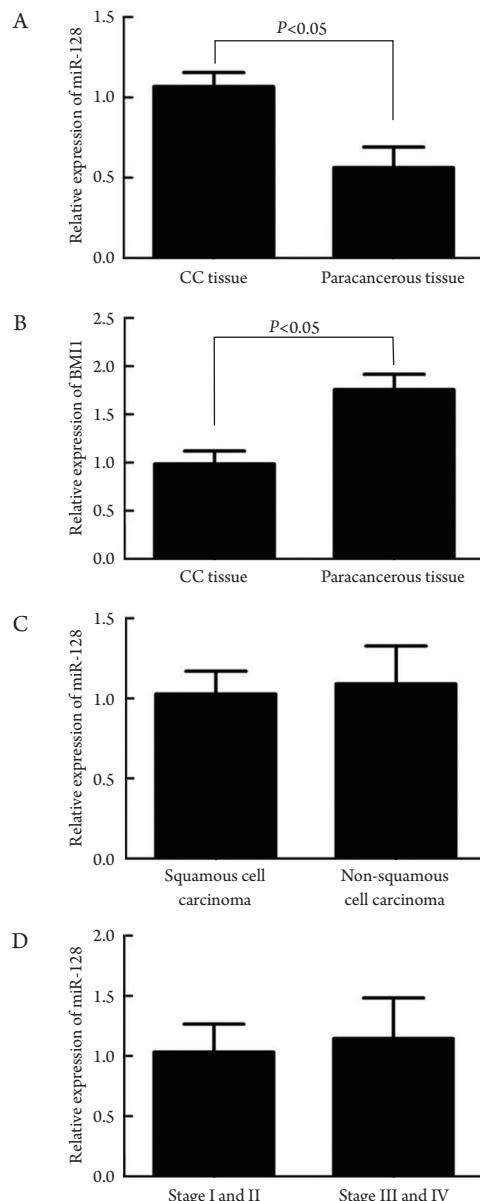


图2 miR-128-3p及BMI1在CC中的相对表达量

Figure 2 Relative expression of miR-128-3p and BMI1 in CC tissues

(A) miR-128-3p在CC组织及瘤旁组织的相对表达量; (B) BMI1在CC组织及瘤旁组织的相对表达量; (C) miR-128-3p在不同病理分型CC患者组织中的相对表达量; (D) miR-128-3p在不同分期CC患者组织中的相对表达量。  
(A) Relative expression of miR-128-3p in CC tissues and adjacent tissues; (B) Relative expression of BMI1 in CC tissues and adjacent tissues; (C) Relative expression of miR-128-3p in tissues of CC patients with different pathological types; (D) Relative expression of miR-128-3p in tissues of CC patients at different stages.

### 2.3 miR-128-3p 过表达下调 BMI1 表达

采用Western印迹法验证miR-128-3p是否负性调节内源性BMI1蛋白的表达。重建miR-128-3p过表达后，BMI1表达含量降低，并进行灰度值定量分析，BMI1含量降低( $43\% \pm 0.12$ )，差异有统计学意义( $P=0.029$ ，图3)。

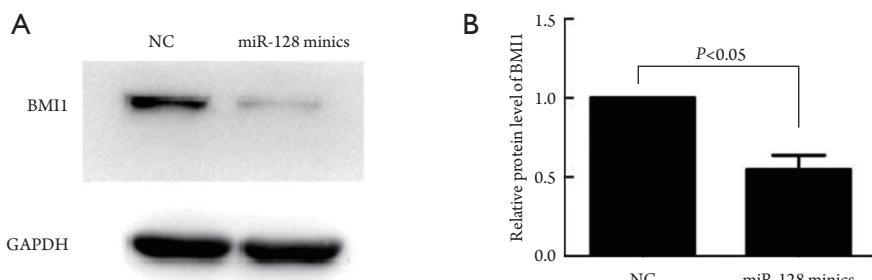


图3 miR-128-3p 过表达后 BMI1 在 HeLa 细胞株中的内源性表达

Figure 3 Endogenous expression of BMI1 protein in HeLa after overexpression of miR-128-3p

(A)HeLa 细胞株中 BMI1 蛋白被 miR-128-3p 下调；(B)BMI1 及 GAPDH 灰度值分析。

(A) BMI1 protein was downregulated by miR-128-3p in HeLa cell line; (B) Analysis of BMI1 and GAPDH gray value.

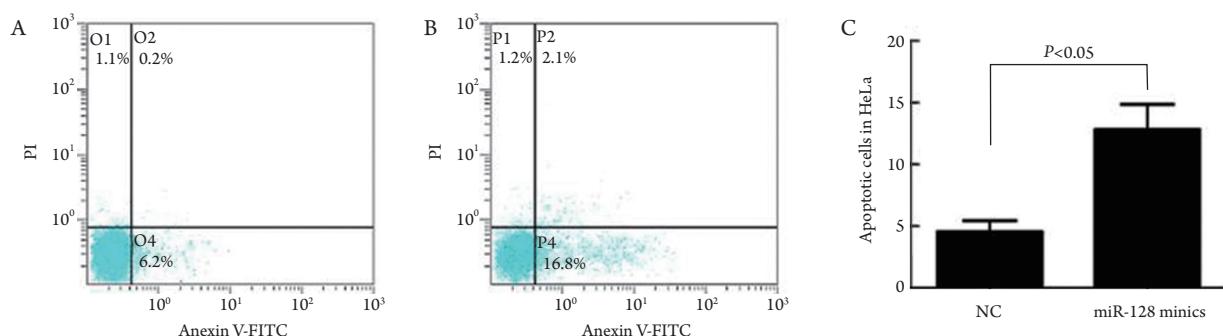


图4 miR-128-3p促进HeLa细胞凋亡

Figure 4 miR-128-3p promoted apoptosis of HeLa cells

(A)转染NC后HeLa细胞凋亡；(B)转染miR-128-3p模拟物后HeLa细胞凋亡；(C)miR-128-3p过表达后HeLa细胞凋亡，检测时间为转染后48 h。

(A) HeLa cells apoptosis after transfection of NC; (B) HeLa cell apoptosis after transfection of miR-128-3p mimics; (C) HeLa cell apoptosis after overexpression of miR-128-3p. The detection time was 48 h after transfection.

### 3 讨论

CC是一种严重威胁女性的生存与健康的恶性肿瘤，其发病机制研究及临床诊疗虽已取得不错的进展，但仍需更加深入的研究。近年来，一系列针对miRNA的研究为明确CC发生、发展的机制提供了新方向。Lee等<sup>[10]</sup>通过Taqman探针法，分析了10例CC患者中miRNA的差异性表达，发现70种

miRNA存在显著上调，其中包括miR-199-s，miR-9，miR199a\*，miR-199a，miR-199b，miR-145，miR-133a，miR-133b，miR-214及miR-127等；2种存在miRNA显著下调，分别为miR-149及miR-203。随后有研究<sup>[11]</sup>发现miR-187在CC中低表达并预示患者预后较差。

本研究结果显示：miR-128-3p在CC中存在显著下调，提示miR-128-3p具有可作为检测CC的标

志物的潜在可能性。miR-128-3p在肿瘤中的作用尚存在争议, 有研究<sup>[12]</sup>认为: miR-128-3p是一种新的原癌基因, 并通过靶向抑癌基因PHF6抑制T淋巴细胞白血病的增殖。也有研究<sup>[13]</sup>认为: miR-128-3p作为抑癌基因在肝癌组织中低表达, 通过靶向PIK3R1抑制肝癌细胞的增殖, 其低表达预示患者预后较差。然而, miR-128-3p在CC中的作用目前尚未有相关研究。miRNA具有时空特异性和组织特异性, 同一miRNA可以在发育的不同阶段和不同的组织中发挥不同的调控作用<sup>[14]</sup>。因此, 研究miR-128-3p在CC中的表达可辅助诊断CC, 具有重要意义。作为检测指标, 最方便、最有效的来源是外周血, 但受限于标本收集, 本研究目前并未检测miR-128-3p在外周血中的表达, 限制了本研究应用的广泛性, 但外周血和组织中miRNA的表达通常具有显著相关性, 笔者也将继续深入研究。

本研究首次发现miR-128-3p靶向BMI1, 并通过荧光素酶报告基因检测及WB检测验证。BMI1通常被认为是一种原癌基因, 通过调节肿瘤干细胞的自我更新能力促进多种肿瘤的进展<sup>[15-16]</sup>。BMI1过表达会导致乳腺上皮细胞侵袭能力增加, 并调节其衰老和永生<sup>[17]</sup>; 同时也可辅助预测CC的转移<sup>[18]</sup>。此外, 在HeLa细胞株中, 敲除BMI1可上调HOXC13, HOXA9及p16INK4a的表达, 并导致细胞周期阻滞<sup>[19]</sup>。本研究通过过表达miR-128-3p, 发现BMI1表达显著增加, 并导致HeLa细胞凋亡增加, 与上述研究结论一致。

综上所述, miR-128-3p在CC组织中低表达, 可作为CC诊断的潜在生物标志物, 并可通过过表达miR-128-3p下调原癌基因BMI1促进肿瘤细胞的凋亡, 提示miR-128-3p可作为CC患者潜在的治疗靶点。

## 参考文献

- 张伟东, 苗树军. 我国恶性肿瘤死亡率流行病学特征分析[J]. 中国健康教育, 2009, 25(4): 246-248.  
ZHANG Weidong, MIAO Shujun. Epidemiological characteristics of malignant tumor mortality in China[J]. Chinese Journal of Health Education, 2009, 25(4): 246-248.
- 李晓兰. 宫颈癌发病年轻化趋势分析[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(23): 3206-3207.  
LI Xiaolan. Analysis of the trend of cervical cancer incidence in China[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2007, 22(23): 3206-3207.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- Garofalo M, Croce CM. microRNAs: master regulators as potential therapeutics in cancer[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2011, 51: 25-43.
- Liu X. Up-regulation of miR-20a by HPV16 E6 exerts growth-promoting effects by targeting PDCD6 in cervical carcinoma cells[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102: 996-1002.
- Wen F, Xu JZ, Wang XR. Increased expression of miR-15b is associated with clinicopathological features and poor prognosis in cervical carcinoma[J]. Arch Gynecol Obstet, 2017, 295(3): 743-749.
- Huang N, Wu J, Qiu W, et al. MiR-15a and miR-16 induce autophagy and enhance chemosensitivity of Camptothecin[J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(6): 941-948.
- 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 宫颈癌及癌前病变规范化诊疗指南(试行)[J]. 慢性病学杂志, 2013, 5(6): 401-410.  
National Health and Family Planning Commission of People's Republic of China. Guidelines for the standardized diagnosis and treatment of cervical cancer and precancerous lesions (trial)[J]. Chronic Pathematology Journal, 2013, 5(6): 401-410.
- Hacker NF. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2009, 105(2): 105-106.
- Lee JW, Choi CH, Choi JJ, et al. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(9): 2535-2542.
- Lin M, Xue XY, Liang SZ, et al. MiR-187 overexpression inhibits cervical cancer progression by targeting HPV16 E6[J]. Oncotarget, 2017, 8(38): 62914-62926.
- Mets E, Van Peer G, Van der Meulen J, et al. MicroRNA-128-3p is a novel oncomiR targeting PHF6 in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Haematologica, 2014, 99(8): 1326-1333.
- Huang CY, Huang XP, Zhu JY, et al. miR-128-3p suppresses hepatocellular carcinoma proliferation by regulating PIK3R1 and is correlated with the prognosis of HCC patients[J]. Oncol Rep, 2015, 33(6): 2889-2898.
- Selbach M, Schwahnässer B, Thierfelder N, et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs[J]. Nature, 2008, 455(7209): 58-63.
- Zhang Z, Bu X, Chen H, et al. Bmi-1 promotes the invasion and migration of colon cancer stem cells through the downregulation of E-cadherin[J]. Int J Mol Med, 2016, 38(4): 1199-1207.
- He S, Iwashita T, Buchstaller J, et al. Bmi-1 over-expression in neural stem/progenitor cells increases proliferation and neurogenesis in culture but has little effect on these functions in vivo[J]. Dev Biol, 2009, 328(2): 257-272.
- Tong YQ, Liu B, Zheng HY, et al. Overexpression of BMI-1 is associated

- with poor prognosis in cervical cancer[J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2012, 8(4): e55-e62.
18. Gavrilescu MM, Todosi AM, Aniței MG, et al. Expression of bmi-1 protein in cervical, breast and ovarian cancer[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2012, 116(4): 1112-1117.
19. Chen F, Li Y, Wang L, et al. Knockdown of BMI-1 causes cell-cycle arrest and derepresses p16INK4a, HOXA9 and HOXC13 mRNA expression in HeLa cells[J]. Med Oncol, 2011, 28(4): 1201-1209.

**本文引用:** 张华东, 张显峰, 刘桂琴, 闫晓歌. miR-128-3p在宫颈癌中的表达及其发病机制[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(7): 1405-1410.  
doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.005

**Cite this article as:** ZHANG Huadong, ZHANG Xianfeng, LIU Guiqin, YAN Xiaoge. Expression of miR-128-3p in cervical cancer and its pathogenesis[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(7): 1405-1410. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.005