

长链非编码 RNA PTENP1 通过 miR-3611/PTEN 基因途径调控宫颈癌进程的分子机制研究

包利利¹ 赵 达² 俞 岩² 周俏苗^{1▲}

1.海南医学院第一临床学院,海南海口 570216;2.海南省妇女儿童医学中心妇科,海南海口 570100

[摘要] 目的 探讨长链非编码 RNA PTENP1(以下简称“PTENP1”)在宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制。方法 选取 2019 年 1 月至 2022 年 12 月海南省妇女儿童医学中心诊断的 54 例的癌组织与癌旁组织,另选取宫颈癌细胞系(HeLa、SiHa、C33A、Caski)和正常宫颈上皮细胞系(H8),采用实时荧光定量 PCR、蛋白质印迹法检测 PTENP1、miR-3611、PTEN 基因、PTEN 蛋白水平。选取合适的宫颈癌细胞系,比较 PTENP1 在细胞质和细胞核中的表达情况,并进一步将其分为空白组(无处理)、pcDNA3.1 组(转染 pcDNA3.1)、pcDNA3.1-PTENP1 组(转染 pcDNA3.1-PTENP1)、NC 组(阴性对照,转染模拟物或抑制剂 NC)、miR-3611 抑制剂组(转染 miR-3611 抑制剂)、pcDNA3.1-PTENP1+NC 组(转染 pcDNA3.1-PTENP1 和 NC)和 pcDNA3.1-PTENP1+miR-3611 mimics 组(转染 pcDNA3.1-PTENP1 和 miR-3611 模拟物)。比较空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组 PTENP1、miR-3611、PTEN 基因、PTEN 蛋白及上皮间质转化的相关指标,采用细胞活力检测及流式细胞仪检测细胞增殖和凋亡情况;比较空白组、NC 组、miR-3611 抑制剂组 miR-3611、PTEN 基因、PTENP1 水平;比较 pcDNA3.1-PTENP1+NC 组和 pcDNA3.1-PTENP1+miR-3611 mimics 组的细胞增殖情况及上皮间质转化的相关指标。采用双荧光素酶报告基因及 RNA 下拉实验验证 miR-3611 与 PTENP1、PTEN 基因的靶向关系。结果 癌组织 PTENP1、PTEN 基因、PTEN 蛋白水平低于癌旁组织,miR-3611 水平高于癌旁组织($P<0.05$)。HeLa、SiHa、C33A、Caski 细胞 PTENP1、PTEN 基因、PTEN 蛋白水平低于 H8 细胞,miR-3611 水平高于 H8 细胞($P<0.05$),后续实验选择 HeLa、Caski 细胞进行,PTENP1 在 HeLa、Caski 细胞质中高表达。pcDNA3.1-PTENP1 组 PTENP1、凋亡率、上皮钙黏素、PTEN 基因高于空白组,细胞增殖活力(培养 48、72、96 h)及 ZEB1、Snail、波形蛋白、miR-3611 低于空白组($P<0.05$)。miR-3611 抑制剂组 miR-3611 低于空白组,PTEN 基因、PTENP1 高于空白组($P<0.05$)。pcDNA3.1-PTENP1+miR-3611 mimics 组细胞增殖活力(培养 48、72、96 h)、上皮钙黏素低于 pcDNA3.1-PTENP1+NC 组,ZEB1、Snail、波形蛋白高于 pcDNA3.1-PTENP1+NC 组($P<0.05$)。野生型 miR-3611 转染生物素标记的 HeLa、Caski 细胞的 PTENP1 水平高于转染生物素标记的空白细胞和突变型 miR-3611 转染生物素标记的细胞,分别转染 PTENP1 或 PTEN 野生型和 miR-3611 模拟物的 293T 细胞的相对荧光活性低于仅转染 PTENP1 或 PTEN 野生型的 293T 细胞($P<0.05$)。结论 PTENP1 通过竞争性结合 miR-3611 调控 PTEN 表达影响宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 长链非编码 RNA;微 RNA;竞争性结合机制;PTEN 基因;宫颈癌

[中图分类号] R73-3

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2024)01(c)-0019-09

DOI:10.20047/j.issn1673-7210.2024.03.04

Study of molecular mechanism of regulation in cervical cancer progression by long non-coding RNA PTENP1 via miR-3611/PTEN gene pathway

BAO Lili¹ ZHAO Da² YU Yan² ZHOU Qiaomiao^{1▲}

1.The First Clinical Medical College, Hainan Medical College, Hainan Province, Haikou 570216, China; 2.Department of Gynecology, Hainan Women and Children's Medical Center, Hainan Province, Haikou 570100, China

[Abstract] Objective To investigate the molecular mechanism of long non-coding RNA PTENP1 (hereinafter referred to as “PTENP1”) in the proliferation, migration, and invasion of cervical cancer cells. **Methods** Cancer tissues and adjacent tissues of 54 patients with cervical cancer diagnosed in Hainan Women and Children's Medical Center from January 2019 to December 2022 were selected, and cervical cancer cell lines (HeLa, SiHa, C33A, Caski) and normal cervical epithelial cell line (H8) were selected. The levels of PTENP1, miR-3611, PTEN gene, and PTEN protein were detected by real-time fluorescent quantitative PCR or Western blot. Appropriate cervical cancer cell lines were selected to compare the expression

[基金项目] 海南省卫生健康行业科研项目(22A200105)。

▲通讯作者

of PTENP1 in cytoplasm and nucleus, and further divided into blank group (no treatment), pcDNA3.1 group (transfected with

pcDNA3.1), pcDNA3.1-PTENP1 group (transfected with pcDNA3.1-PTENP1), NC group (negative control, transfected with either mimic or inhibitor, negative control), miR-3611 inhibitor group (transfected with miR-3611 inhibitor), pcDNA3.1-PTENP1+NC group (transfected with pcDNA3.1-PTENP1 and NC), and pcDNA3.1-PTENP1+miR-3611 mimics group (transfected with pcDNA3.1-PTENP1 and miR-3611 mimics). The levels of PTENP1, miR-3611, PTEN gene, PTEN protein, and epithelial mesenchymal transformation related indexes in blank group, pcDNA3.1 group, and pcDNA3.1-PTENP1 group were compared. Cell viability and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis. The levels of miR-3611, PTEN gene, and PTENP1 in blank group, NC group, and miR-3611 inhibitor group were compared. The cell proliferation and epithelial mesenchymal transformation related indexes were compared between pcDNA3.1-PTENP1+NC group and pcDNA3.1-PTENP1+miR-3611 mimics group. Double luciferase reporter gene and RNA pull-down experiments were used to verify the targeting relationship between miR-3611 and PTENP1 and PTEN gene.

Results The levels of PTENP1, PTEN gene, and PTEN protein in cancer tissues were lower than those in adjacent tissues, and the levels of miR-3611 were higher than those in adjacent tissues ($P<0.05$). The levels of PTENP1, PTEN gene, and PTEN protein in HeLa, SiHa, C33A, and Caski cells were lower than those in H8 cells, and the levels of miR-3611 was higher than those in H8 cells ($P<0.05$). HeLa and Caski cells were selected for subsequent experiments. PTENP1 was highly expressed in HeLa and Caski cytoplasm. The levels of PTENP1, apoptosis rate, E-cadherin, and PTEN gene in pcDNA3.1-PTENP1 group were higher than those in blank group, while cell proliferation activity (cultured 48, 72, 96 h), and levels of ZEB1, Snail, vimentin, miR-3611 were lower than those in blank group ($P<0.05$). The levels of miR-3611 in miR-3611 inhibitor group was lower than that in blank group, and PTEN gene and PTENP1 were higher than those in blank group ($P<0.05$). Cell proliferation activity (cultured 48, 72, 96 h) and the levels of E-cadherin in pcDNA3.1-PTENP1+miR-3611 mimics group were lower than those in pcDNA3.1-PTENP1+NC group, and the levels of ZEB1, Snail, and vimentin were higher than those in pcDNA3.1-PTENP1+NC group ($P<0.05$). The PTENP1 levels of HeLa and Caski cells transfected with wild type miR-3611 biotin marker were higher than those of blank cells transfected with biotin marker and cells transfected with mutant type miR-3611 biotin marker, the relative fluorescence activity of 293T cells transfected with PTENP1 or PTEN wild type and miR-3611 mimics was lower than that of 293T cells transfected with PTENP1 or PTEN wild type, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** PTENP1 regulates the expression of PTEN by competitively binding to miR-3611 and affects the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells.

[Key words] Long non-coding RNA; MicroRNA; Competitive binding mechanism; PTEN gene; Cervical cancer

宫颈癌是女性癌症中第四大常见的癌症^[1-2]。尽管手术及放化疗方法在过去几十年里逐渐被应用于宫颈癌的治疗,但其 5 年预后情况仍较差^[3]。因此,深入开展宫颈癌机制探讨对改善宫颈癌患者的预后及新疗法的开发具有重要意义。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)具有染色质修饰、转录、剪接和表观遗传调控等多种生物学功能^[4-7]。多项研究表明, lncRNA 可以调节 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑,并作为微 RNA(microRNA, miRNA)的前体调控肿瘤的发生^[8-9]。近期研究表明, lncRNA 通过内源性竞争 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)机制调控 miRNA 对靶基因的抑制作用,参与癌症调控过程^[10]。lncRNA PTENP1(以下简称“PTENP1”)是肿瘤抑制因子 PTEN 基因的“假基因”,在许多恶性肿瘤中通过调节 PTEN 基因的表达发挥其抑制肿瘤的功能,但其在宫颈癌中的作用尚不清楚^[11-14]。因此本研究旨在探讨 PTENP1 在宫颈癌进程中的作用及其机制,为宫颈癌的早期筛查及靶向治疗提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究选取 54 例 2019 年 1 月至 2022 年 12 月在海南省妇女儿童医学中心确诊的宫颈癌患者,收集其癌组织和癌旁组织(与肿瘤组织距离 ≥ 5 cm)。患者年龄(45.34 ± 12.73)岁,肿瘤分期 I ~ II 期 27 例, III ~ IV 期 27 例。纳入标准:①经病理诊断为宫颈癌;②资料完整。排除标准:①远处转移;②合并其他恶性肿瘤;③妊娠期或哺乳期;④手术前经过放化疗处理。本研究经过海南省妇女儿童医学中心医学伦理学委员会批准(HNWC MC 伦审 2022 年第[136]号)。

1.2 细胞系选择与培养

宫颈癌细胞系(HeLa、SiHa、C33A、Caski)、正常宫颈上皮细胞 H8 及 293T 细胞均购自中国科学院上海生命科学研究院。所有细胞置于含有 10% FBS 的 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)中,于 37 °C 和 5%的 CO₂ 条件下培养。

1.3 细胞分组和相应的处理

选取合适的宫颈癌细胞系进行下一步实验,将处于对数生长期的细胞分为以下七组:空白组(无处理)、pcDNA3.1 组(转染 pcDNA3.1)、pcDNA3.1-PTENP1 组(转染 pcDNA3.1-PTENP1)、NC 组(阴性对照,转染模拟物或抑制剂 NC)、miR-3611 抑制剂组(转染 miR-3611 抑制剂)、pcDNA3.1-PTENP1+NC 组(转染 pcDNA3.1-PTENP1 和 NC)、pcDNA3.1-PTENP1+miR-3611 mimics 组(转染 pcDNA3.1-PTENP1 和 miR-3611 模拟物)。其中 pcDNA3.1、pcDNA3.1-PTENP1、抑制剂 NC、miR-3611 抑制物、NC、miR-3611 模拟物均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。细胞转染采用 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen,748253)进行,所有细胞实验均设置独立的 3 个复孔。

1.4 PTENP1 在细胞中的亚定位检测

将宫颈癌细胞用 PBS 清洗并置于冰上,用 500 ml 预冷的细胞分馏缓冲液重新悬浮细胞,在冰上溶解 10 min。细胞离心 5 min(转速为 5 000 r/min,半径为 165 mm),将上清液(细胞质)与沉淀(细胞核)分离,然后进行 PTENP1 相对表达量的检测。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测

使用 Trizol(美国 Invitrogen,1422)试剂提取组织和细胞的总 RNA,用 AMV 反转录酶处理 1 μ g RNA 以获得 cDNA。PCR 引物序列见表 1。GAPDH 作为 mRNA 相对定量的内参基因,U6 用于细胞核内 RNA 和 miRNA 的内参基因。PCR 扩增的条件如下:94℃预变性 5 min,94℃变性 40 s,60℃退火 40 s,72℃延伸 1 min,72℃延伸 10 min 的 40 个循环。反应体系为 20.0 μ l,包括 TB Green Premix Ex Taq 10.0 μ l,正、反向引物分别 0.4 μ l,ROX Reference Dye(50 $\times$)0.4 μ l,DNA 模板 2.0 μ l,灭菌水 6.8 μ l。最后采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析数据。

1.6 CCK-8 检测

将处理后的宫颈癌细胞悬液稀释后接种于 96 孔板,1 $\times 10^3$ 个/孔。分别于培养 0、24、48、72、96 h 的孔中加入 10 μ l 的 CCK-8(美国 Sigma),然后培养 4 h,用酶标仪(美国 Bio-Rad,6532)在 450 nm 波长下测量光密度(optical density,OD),每个时间点设置独立的 3 个复孔。

1.7 流式细胞仪检测

将体积为 200 μ l 的细胞沉淀重悬在 100 μ l 的结合缓冲液中,加入 2 μ l 的 Annexin-V-FITC(20 μ g/ml),并在冰上混合。15 min 后加入 300 μ l 的 PBS。每个样品在 30 min 内加入 1 μ l PI 后进行上机检测,每组设置独立的 3 个复孔。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	引物大小(bp)
miR-3611		26
正向引物	TTCACCACCTTCTCCACCC	
反向引物	GAATACCTCGGACCCTGC	
PTENP1		43
正向引物	ACCCTGTTGCTTTACCTTCGT	
反向引物	CGCGAGCCGAAAGTTTGTGA	
PTEN 基因		38
正向引物	CAAGCTAGTAGTCCTTGGTTCAG	
反向引物	GGAATCTTCTATCGTTGGGTCAT	
ZEB1		42
正向引物	AACAGCAACTCCACTCTTC	
反向引物	CCTGTTGCTGTAGCCGTATT	
Snail		32
正向引物	ACCCTGTTGCTTTACCTTCGT	
反向引物	CGCGAGCCGAAAGTTTGTGA	
GAPDH		41
正向引物	TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT	
反向引物	ACCAAATCCGTTGACTCCGACCTT	
U6		29
正向引物	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	
反向引物	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	

1.8 蛋白质免疫印迹法检测

使用 BCA 试剂盒(武汉博斯特生物技术有限公司,33528)提取并测定各组细胞和组织的蛋白质。分解后的蛋白质被转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% BSA 进行封闭。PTEN 蛋白(1:1 000,ab43756)、上皮钙黏素(1:1 000,ab7486)、波形蛋白(1:1 000,ab13457)和 β -actin(1:3 000,ab2378)的一抗购买自美国 Abcam。加入一抗并在 4℃下孵育过夜后,5 min 内用 TBST 洗膜 3 次,加入相应的二抗[迈特(上海)生物科技有限公司,178263],在室温下孵育 1 h。使用 Bio-Rad 成像仪(美国 Bio-Rad)来获得图像。目标条带的灰度值由 Image J 软件进行分析。每个测试重复 3 次。

1.9 免疫荧光染色

采用 4%多聚甲醛在室温下固定 30 min 后在室温下加入 0.1% Triton X-100。约 10 min 后,加入正常山羊血清后加入上皮钙黏素和波形蛋白的抗体,在 37℃的摇床下孵育 2 h 后用 PBST 清洗 3 次,采用显微镜进行观察拍照。

1.10 双荧光素酶报告实验

使用生物信息学软件(<http://www.targetscan.org>)来预测 PTENP1 和 miR-3611 的关系。合成的 PTENP1 3'UTR 基因序列通过限制性酶位点 Bamh1 和 Ecor1 将 PTENP1 3'UTR 基因序列引入到 pMIR-reporter。将确认的野生型和突变型质粒分别与模拟物 NC 和 miR-3611 模拟物转染到 293 T 细胞。使用生物信息学软件(<http://www.targetscan.org>)预测 miR-3611 和 PTEN 基因 3'UTR 的结合部位。构建 PTEN 基因 3'

UTR 野生型质粒, 合成 PTEN 基因 3'UTR 启动子序列与 miR-3611 的结合位点, 构建了 PTEN 基因 3'UTR 突变体质粒。然后将 PTEN 基因 3'UTR 野生型和 PTEN 基因 3'UTR 突变型质粒转染给模拟物 NC 和 miR-3611 模拟物转入 293T 细胞, 使用 Lipofectamine 2000 调节剂转染 48 h 后使用萤光素酶试剂盒 (美国 BioVision, BC1573) 来检测萤光素酶的活性。

1.11 RNA 下拉实验

将总体积为 50 nmol/ml 的 miR-3611 转染生物素标记的野生型和 50 nmol/ml 的 miR-3611 转染生物素标记的突变型分别转染到细胞。转染 48 h 后, 收获细胞并用 PBS 清洗, 然后用细胞裂解缓冲液 (美国 Ambion, 2375) 孵育 10 min。然后制备 50 ml 的细胞裂解液, 用 M-280 链霉菌素预涂的无核糖核酸酶在 4℃ 下孵育 3 h 后应用实时荧光定量 PCR 检测 PTENP1 的表达。

1.12 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行数据分析。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 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 癌组织与癌旁组织、各个宫颈癌细胞系及不同处理组中 PTENP1 的表达量比较

癌组织中 PTENP1 相对表达量低于癌旁组织,

HeLa、SiHa、C33A、Caski 细胞 PTENP1 相对表达量低于 H8 细胞 ($P < 0.05$)。选择宫颈癌细胞系中 PTENP1 相对表达量最低的 Caski 细胞和最高的 HeLa 细胞进行后续实验, PTENP1 在 Caski、HeLa 细胞质中高表达。Caski、HeLa 细胞的 pcDNA3.1-PTENP1 组 PTENP1 相对表达量均高于空白组 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组细胞增殖活力及凋亡率比较

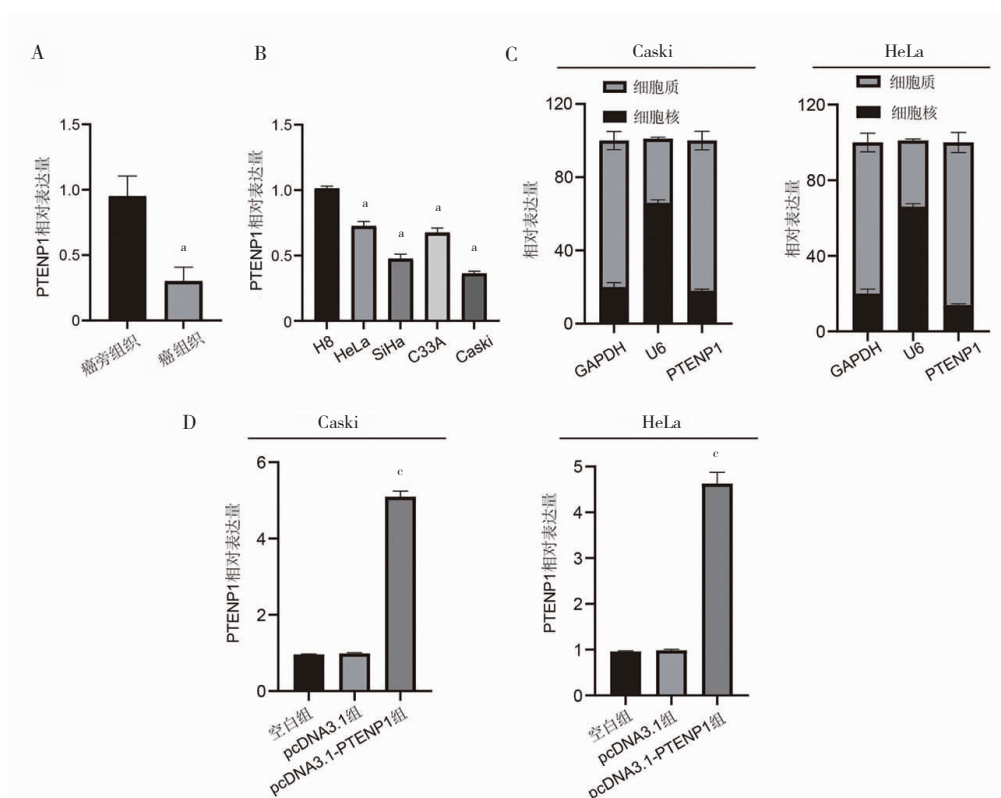
Caski、HeLa 细胞的 pcDNA3.1-PTENP1 组增殖活力 (培养 48、72、96 h) 低于空白组, 凋亡率高于空白组 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组上皮间质转化相关指标比较

Caski、HeLa 细胞的 pcDNA3.1-PTENP1 组 ZEB1、Snail mRNA 相对表达量低于空白组, 上皮钙黏素、波形蛋白水平高于空白组 ($P < 0.05$)。见图 3。

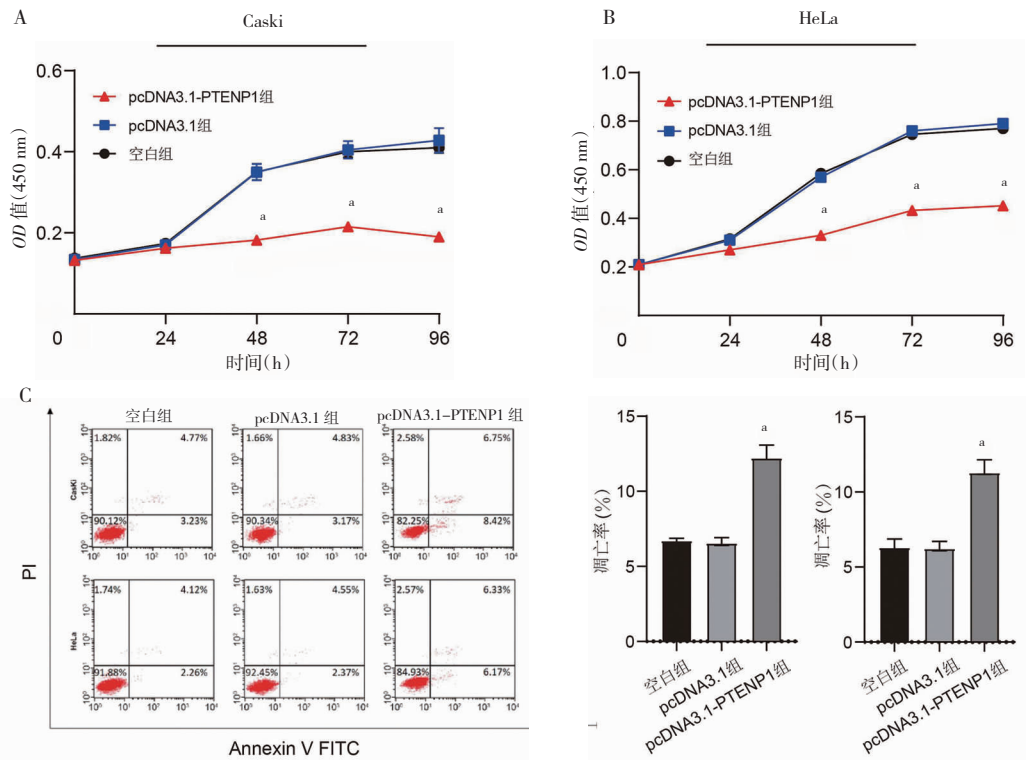
2.4 癌组织与癌旁组织、各个宫颈癌细胞系及不同处理组中 miR-3611 的表达比较

癌组织 miR-3611 相对表达量高于癌旁组织, HeLa、SiHa、C33A、Caski 细胞 miR-3611 相对表达量高于 H8 细胞 ($P < 0.05$)。Caski、HeLa 细胞 miR-3611 抑制剂组 miR-3611 相对表达量低于空白组 ($P < 0.05$)。见图 4。



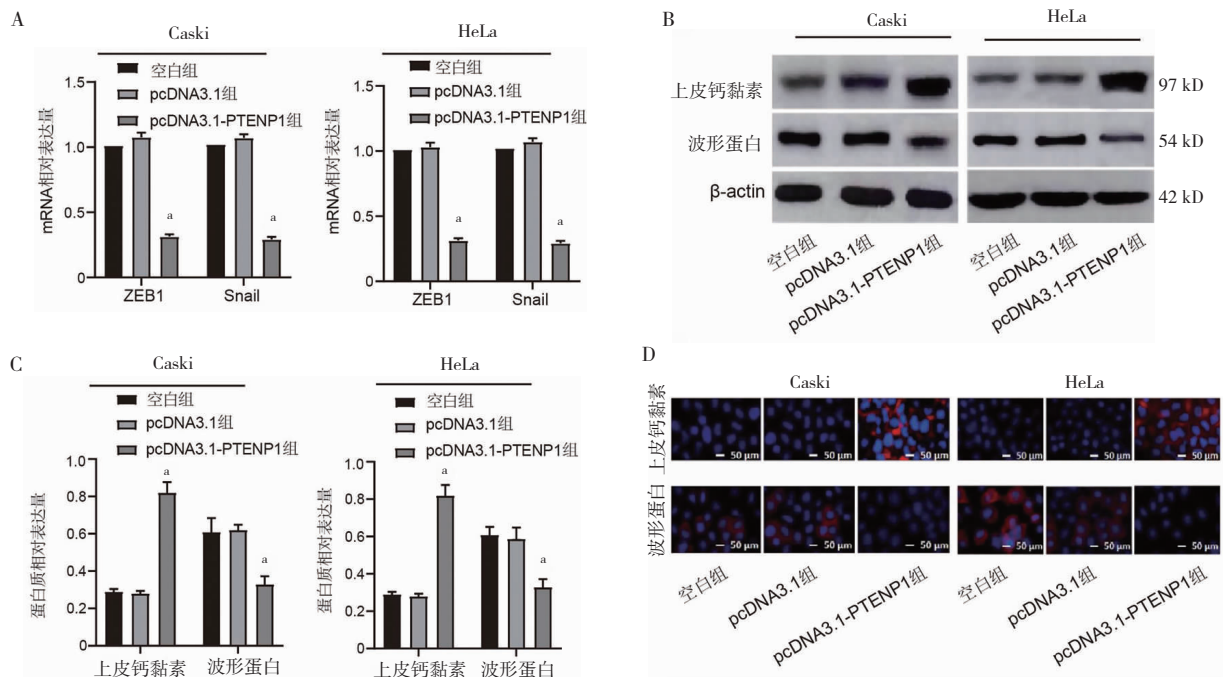
A: 癌组织和癌旁组织 PTENP1 相对表达量比较; B: HeLa、SiHa、C33A、Caski、H8 细胞 PTENP1 相对表达量比较; C: HeLa、Caski 细胞核、细胞质中 PTENP1 相对表达量比较; D: Caski、HeLa 细胞空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组 PTENP1 相对表达量比较。与癌组织比较, $^a P < 0.05$; 与 H8 比较, $^b P < 0.05$; 与空白组比较, $^c P < 0.05$ 。

图 1 癌组织与癌旁组织及各个宫颈癌细胞系中 PTENP1 的表达比较 ($n=3$)



A: Caski、HeLa 细胞空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组不同时间点细胞增殖活力比较; B: 流式细胞仪检测 Caski、HeLa 细胞空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组细胞凋亡; C: Caski、HeLa 细胞空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组凋亡率比较。与空白组比较, $^aP<0.05$ 。

图 2 空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组细胞增殖活力及凋亡率比较($n=3$)



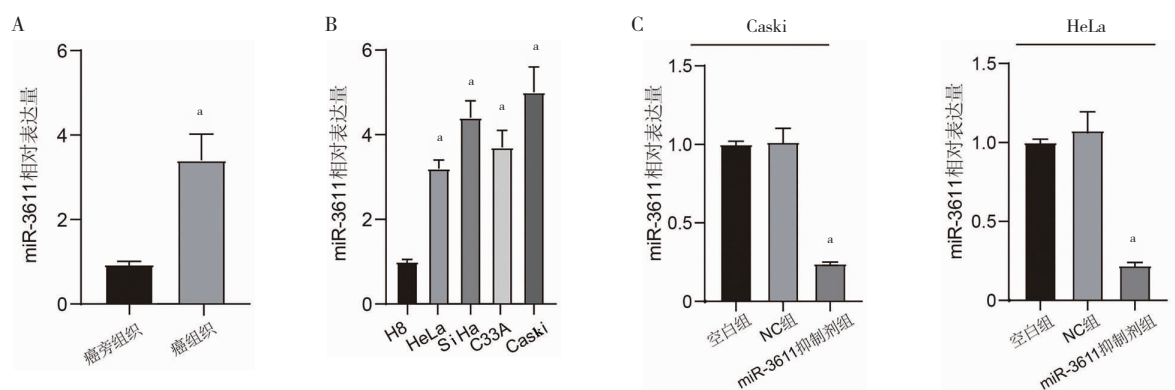
A: Caski、HeLa 细胞空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组 ZEB1、Snail mRNA 相对表达量比较; B: Caski、HeLa 细胞空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组上皮钙黏素、波形蛋白条带图; C: Caski、HeLa 细胞空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组上皮钙黏素、波形蛋白水平比较; D: 免疫荧光检测上皮钙黏素、波形蛋白。与空白组比较, $^aP<0.05$ 。

图 3 空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组上皮间质转化相关指标比较($n=3$)

2.5 pcDNA3.1-PTENP1+NC 组、pcDNA3.1-PTENP1+miR-3611 mimics 组不同时间点细胞增殖活力及上皮间质转化相关指标比较

Caski、HeLa 细胞 pcDNA3.1-PTENP1+miR-3611

mimics 组细胞增殖活力(培养 48、72、96 h)、上皮钙黏素低于 pcDNA3.1-PTENP1+NC 组, ZEB1、Snail mRNA 相对表达量及波形蛋白水平高于 pcDNA3.1-PTENP1+NC 组($P<0.05$)。见图 5。



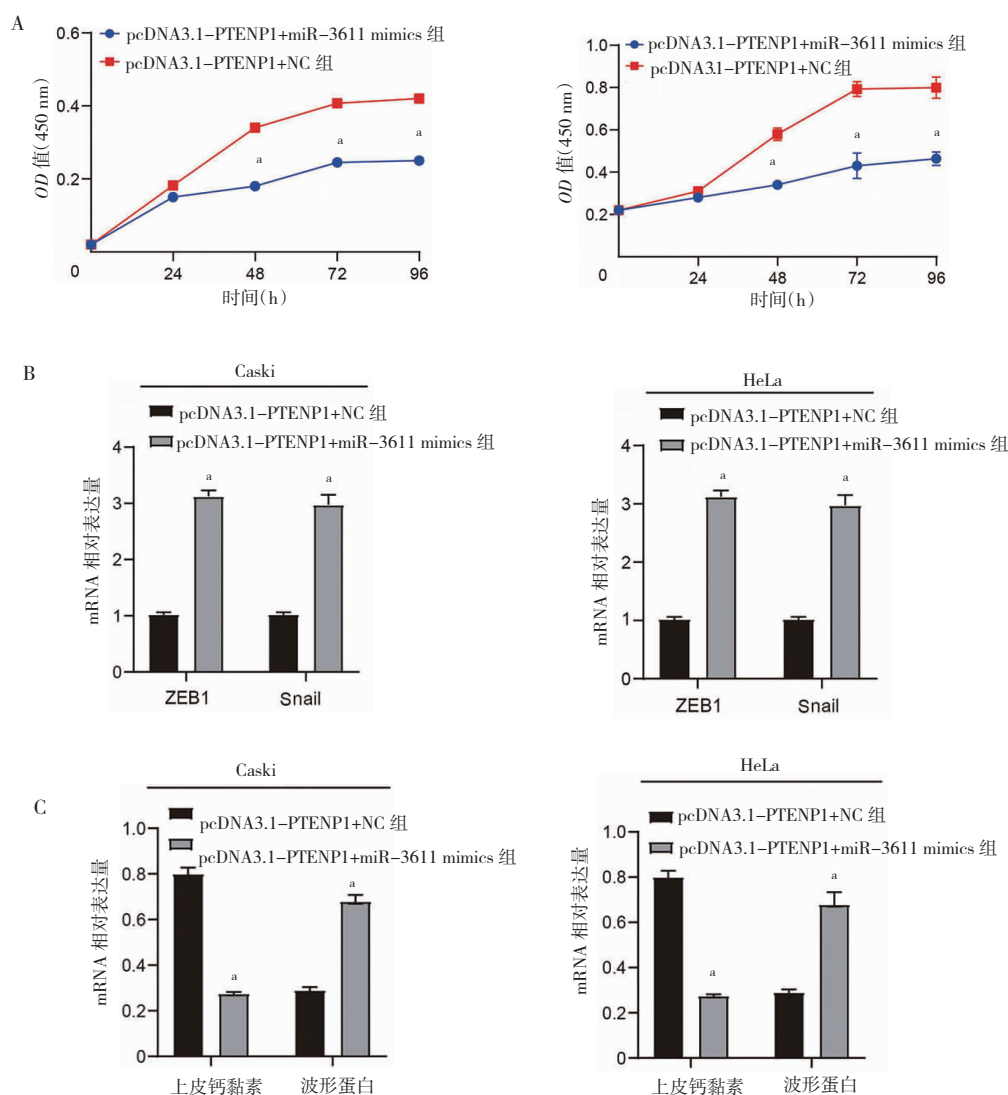
A: 癌组织和癌旁组织 miR-3611 相对表达量比较; B: HeLa, SiHa, C33A, Caski, H8 细胞 miR-3611 相对表达量比较; C: Caski, HeLa 细胞的空白组、NC 组、miR-3611 抑制剂组 miR-3611 相对表达量比较。与癌组织比较, $^aP<0.05$; 与 H8 细胞比较, $^bP<0.05$; 与空白组比较, $^cP<0.05$ 。

图 4 癌组织与癌旁组织及各个宫颈癌细胞系中 miR-3611 的表达情况 ($n=3$)

2.6 癌组织与癌旁组织、各个宫颈癌细胞系及不同处理组中 PTEN 基因及其蛋白的表达比较

癌组织中 PTEN 基因及其蛋白低于癌旁组织, HeLa、

SiHa, C33A, Caski 细胞 PTEN 基因及其蛋白低于 H8 细胞 ($P<0.05$)。Caski、HeLa 细胞的 pcDNA3.1-PTENP1 组 PTEN 基因高于空白组, miR-3611 抑制剂组 PTEN 基



A: Caski, HeLa 细胞 pcDNA3.1-PTENP1+NC 组、pcDNA3.1-PTENP1+miR-3611 mimics 组不同时间点细胞增殖活力比较; B: Caski, HeLa 细胞 pcDNA3.1-PTENP1+NC 组、pcDNA3.1-PTENP1+miR-3611 mimics 组 ZEB1, Snail mRNA 相对表达量比较; C: Caski, HeLa 细胞 pcDNA3.1-PTENP1+NC 组、pcDNA3.1-PTENP1+miR-3611 mimics 组上皮钙黏素、波形蛋白水平比较。与 pcDNA3.1-PTENP1+NC 组比较, $^aP<0.05$ 。

图 5 pcDNA3.1-PTENP1+NC 组、pcDNA3.1-PTENP1+miR-3611 mimics 组不同时间点细胞增殖活力及上皮间质转化相关指标比较 ($n=3$)

因高于空白组($P<0.05$)。见图 6。

2.7 PTENP1 与 miR-3611 及 PTEN 的靶向关系验证

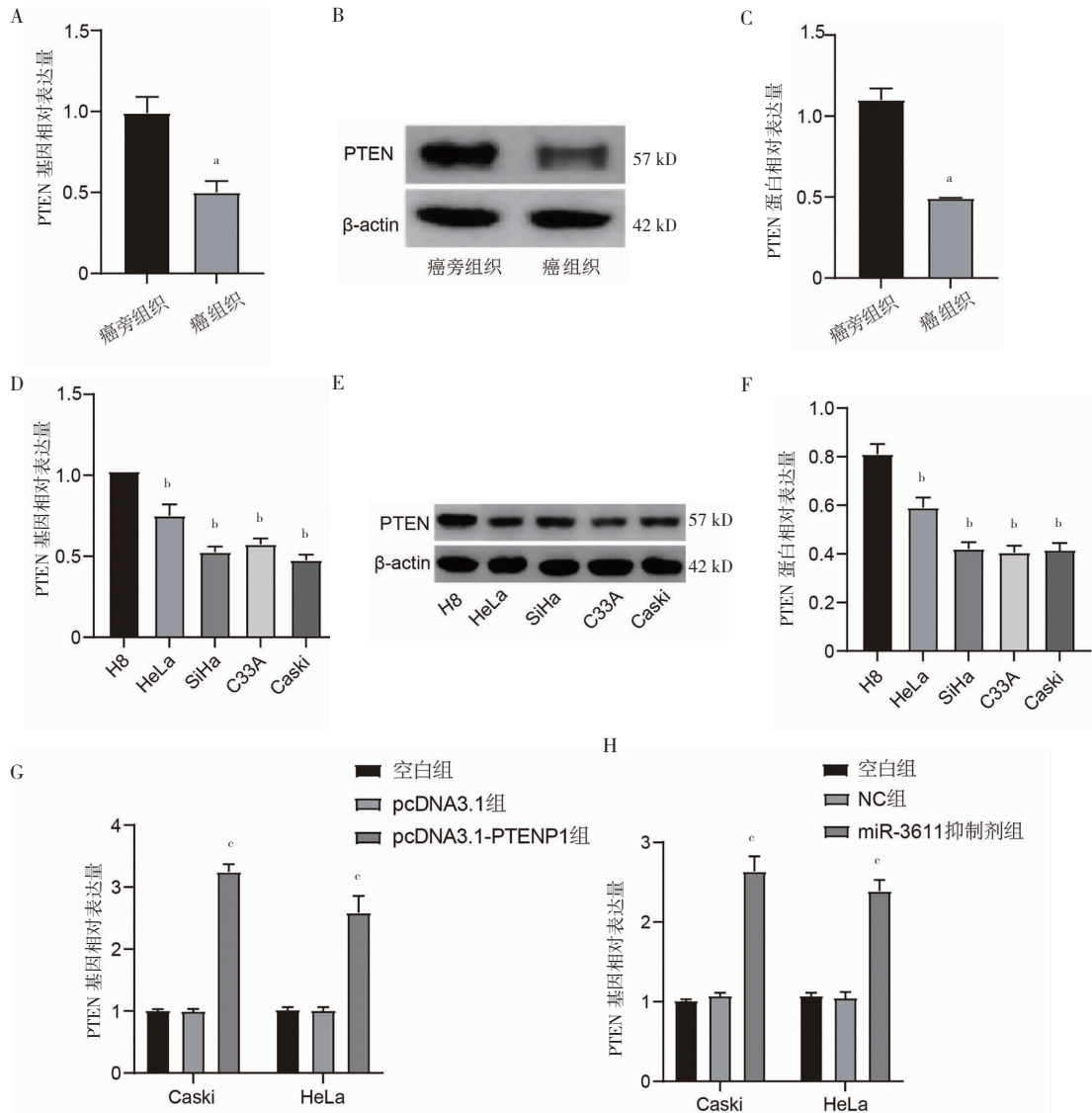
Caski、HeLa 细胞 pcDNA3.1-PTENP1 组 miR-3611 相对表达量高于空白组, miR-3611 抑制剂组 PTENP1 相对表达量高于空白组($P<0.05$)。野生型 miR-3611 转染生物素标记的 Caski、HeLa 细胞的 PTENP1 相对表达量高于转染生物素标记的空白细胞和突变型 miR-3611 转染生物素标记的细胞, 分别转染 PTENP1 或 PTEN 基因野生型和 miR-3611 模拟物的 293T 细胞的相对荧光活性低于仅转染 PTENP1 或 PTEN 基因野生型的 293T 细胞($P<0.05$)。见图 7。

3 讨论

目前研究表明, ceRNA 调控网络参与了各种生物

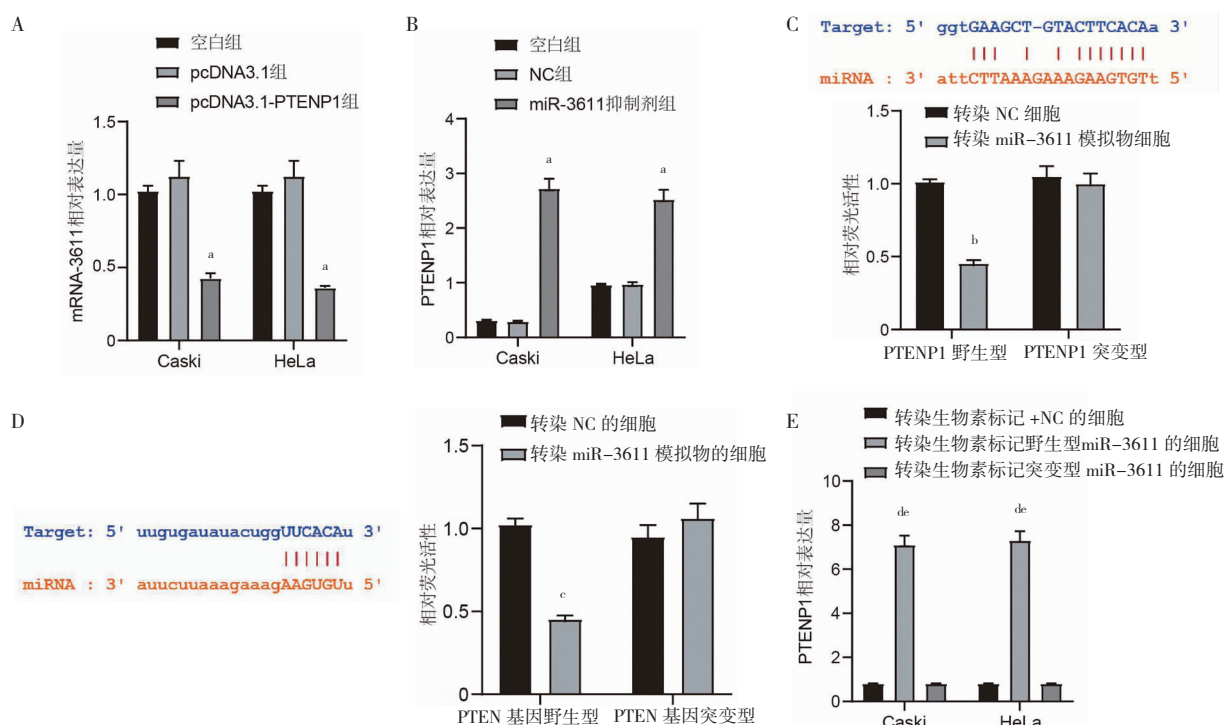
活动, 如调节癌症发生和发展的基因表达^[15]。本研究表明, PTENP1 通过靶向 miR-3611 来上调 PTEN 基因, 以抑制宫颈癌中的细胞增殖并促进上皮间质转化。miR-3611 是位于人类染色体 7 上的 DNA 复制基因 MCM7 的第 13 个内含子^[16]。既往研究显示, miR-3611 在肿瘤发生中的作用与 PTEN 基因肿瘤通路和 TGF- β 信号通路相关^[17-19]。本研究中的双萤光素酶报告基因测定验证了 miR-3611 与 PTEN 基因的靶向关系, 进一步 RNA 下拉实验结果也提示 PTENP1 和 miR-3611 之间的结合关系。

PTEN 基因是 PI3K-Akt 信号通路的重要负调节因子, 支持 PTEN 基因和 PTENP1 在调节肿瘤进展中细胞凋亡。此外, 上皮间质转化被认为是肿瘤细胞侵



A: 癌组织与癌旁组织 PTEN 基因相对表达量比较; B: 癌组织与癌旁组织 PTEN 蛋白条带图; C: 癌组织与癌旁组织 PTEN 蛋白水平比较; D: HeLa、SiHa、C33A、Caski、H8 细胞 PTEN 基因相对表达量比较; E: HeLa、SiHa、C33A、Caski、H8 细胞 PTEN 蛋白条带图; F: HeLa、SiHa、C33A、Caski、H8 细胞 PTEN 蛋白水平比较; G: Caski、HeLa 细胞空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组 PTEN 基因相对表达量比较; H: Caski、HeLa 细胞的空白组、NC 组、miR-3611 抑制剂组 PTEN 基因相对表达量比较。与癌组织比较, $P<0.05$; 与 H8 细胞比较, $P<0.05$; 与空白组比较, $P<0.05$ 。

图 6 癌组织与癌旁组织、各个宫颈癌细胞系及不同处理组的 PTEN 基因及其蛋白的表达比较($n=3$)



A: Caski、HeLa 细胞空白组、pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-PTENP1 组 mRNA-3611 相对表达量比较; B: Caski、HeLa 细胞的空白组、NC 组、miR-3611 抑制剂组 PTENP1 相对表达量比较; C: 双荧光素酶报告检测 miR-3611 与 PTENP1 的靶向性; D: RNA 下拉实验检测 PTENP1 和 miR-3611 的相互作用; E: 双荧光素酶报告检测 miR-3611 与 PTEN 基因的靶向性。与空白组比较, $P < 0.05$; 转染 PTENP1 野生型 +NC 的 293T 细胞比较, $P < 0.05$; 与转染 PTEN 基因野生型 +NC 的 293T 细胞比较, $P < 0.05$; 与转染生物素标记 +NC 的 Caski、HeLa 细胞比较, $P < 0.05$; 与转染生物素标记突变型 miR-3611 的 Caski、HeLa 细胞比较, $P < 0.05$ 。

图 7 PTENP1 与 miR-3611 及 PTEN 的靶向关系验证 ($n=3$)

袭和转移的最重要机制之一,其中上皮细胞具有间充质和成纤维细胞样特性^[20-24]。先前研究表明,PTEN 基因缺失或 PI3K/Akt 信号通路激活可促进前列腺癌细胞的上皮间质转化和肿瘤进展,本研究与这一观察结果一致^[29]。尽管本研究已经在细胞实验对这一结论进行探究,但目前仍然缺少必要的动物及深入的临床数据对这一分子机制进行验证。因此这也是未来的主要研究方向。

综上所述,本研究阐明了 PTENP1 与 miR-3611 竞争性结合以调节 PTEN 基因表达影响宫颈癌进程,以上结果为宫颈癌的靶向治疗及早期诊断提供了理论支持。

利益冲突声明: 本文所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 史跃燕,曹晓莉,岑春伟,等.LncRNA CCAT2 和 miR200a-3-p 在宫颈癌患者血清中的表达水平及临床意义[J].国际检验医学杂志,2023,44(2):205-210.
- [2] 蔡璟,何敏,宋晶,等.LncRNA UNC5B-AS1 通过调控Toll样受体信号通路对宫颈癌细胞增殖及上皮间质转化的影响[J].中国药理学通报,2023,39(2):258-268.
- [3] 杨月楠,黄乔,杨自为.LncRNA 与宫颈癌的研究进展[J].巴楚医学,2022,5(4):117-120.
- [4] 田秀芳,陈红晓,栾雅静,等.长链非编码 RNA TTTY15/MIF-AS1 在 HPV 感染宫颈癌组织中的表达及其与细胞自噬的关系[J].中华医院感染学杂志,2022,32(19):2997-3001.
- [5] He SH, Feng YQ, Zou W, et al. The Role of the SOX9/lncRNA ANXA2P2/miR-361-3p/SOX9 Regulatory Loop in Cervical Cancer Cell Growth and Resistance to Cisplatin [J]. Front Oncol, 2022, 11(1): 784525.
- [6] Chai YQ, Wang LL, Qu YW, et al. LncRNA MAGI2-As3 Suppresses the Proliferation and Invasion of Cervical Cancer by Sponging MiR-15b [J]. J Healthc Eng, 2022, 1(1): 9707206.
- [7] Zhu DR, Hao Q, Qian M, et al. LncRNA ABHD11-AS1 Participates in the Progression of Cervical Carcinoma by Targeting miR-1254 and Is the Key to the Diagnosis and Treatment of Cervical Carcinoma in the Future [J]. J Healthc Eng, 2022, 1(1): 8387458.
- [8] Zhang WY, Wu QW, Liu Y, et al. LncRNA HOTAIR promotes chemoresistance by facilitating epithelial to mesenchymal transition through miR-29b/PTEN/PI3K signaling in cervical cancer [J]. Cells Tissues Organs, 2021, 211(1): 16-29.
- [9] Liang M, Li YK, Dai TT, et al. lncRNA FEZF1-AS1 regulates

- biological behaviors of cervical cancer by targeting miRNA-1254 [J]. Food Sci Nutr, 2021, 9(9): 4722-4737.
- [10] Liang T, Wang YC, Jiao Y, *et al.* LncRNA MALAT1 Accelerates Cervical Carcinoma Proliferation by Suppressing miR-124 Expression in Cervical Tumor Cells [J]. J Oncol, 2021, 1(1): 8836078.
- [11] He M, Wang YT, Cai J, *et al.* LncRNA DLEU2 promotes cervical cancer cell proliferation by regulating cell cycle and NOTCH pathway [J]. Exp Cell Res, 2021, 402(1): 457.
- [12] Ji YY, Meng M, Miao Y. LncRNA SNHG1 Promotes Progression of Cervical Cancer Through miR-195/NEK2 Axis [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 125-134.
- [13] Ghafouri FS, Khoshbakht T, Hussien BM, *et al.* A review on the role of PTENP1 in human disorders with an especial focus on tumor suppressor role of this lncRNA [J]. Cancer Cell Int, 2022, 22(1): 5297.
- [14] 凌旭坤, 谢文鸿, 张喆, 等. lncRNA PTENP1 通过 miR-142-5p/PTEN 分子轴调控结直肠癌 HCT116 细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(6): 703-707.
- [15] 黄银龙, 连超群, 孙康, 等. 肺腺癌中综合分析竞争性内源 RNA 网络预测潜在的预后 lncRNA[J]. 沈阳医学院学报, 2022, 24(5): 453-462, 473.
- [16] Lu WJ, Yu ZG, Liu J, *et al.* Circular RNA Circ_0005962 Contributes to Lung Adenocarcinoma Cell Proliferation and Stem Cell Formation Through Sponging of miR-3611 and Modulating CYP24A1 Expression [J]. Biochem Genet, 2022, 1(1): 28735.
- [17] Tong M, Fa FW, Xiao HW. LncRNA LINC01772 promotes metastasis and EMT process in cervical cancer by sponging miR-3611 to relieve ZEB1 [J]. Biocell, 2019, 43(3): 218-224.
- [18] Yang Y, Zhang Y, Ding XQ, *et al.* Construction and analysis of the ceRNA network *hsa_circ_0031968/miR-3611/GCG* in lung adenocarcinoma [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(24): 3572.
- [19] Long JY, Danesh FR. Promises and Challenges of miRNA Therapeutics [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2022, 1(1): 3987.
- [20] 刘婷, 张林西. 上皮间质转化在消化系统肿瘤中的研究进展[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2023, 39(2): 52-56.
- [21] 张雪, 赵丽丽, 冯青青, 等. HER-2 通过影响 EMT 增强胃癌细胞的侵袭、迁移及黏附能力[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(16): 2956-2960.
- [22] 曹卫刚, 杨振林. 缺氧诱导因子-1 α 和上皮间质转化相关蛋白在乳腺癌组织中的表达及其与肿瘤血管生成的关系[J]. 肿瘤基础与临床, 2023, 36(4): 277-281.
- [23] 李文华, 王芊文, 王小芳, 等. 肝癌细胞自分泌外泌体通过 TGF- β 1 调控自身细胞学行为[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(7): 1442-1445.
- [24] 徐繁, 张庆, 李潇. C1q 样蛋白 4 通过 PI3K/Akt 信号通路调节乳腺癌干细胞特性和上皮间质转化[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(16): 2977-2982.
- [25] 杨先旭. miR-188-5p、miR-141-3p 靶向抑制 PTEN 激活 Akt 通路促进膀胱癌进展的机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.

(收稿日期: 2023-04-26)