

论著·基础研究

## 宫颈癌细胞通过下调 miR-301b 表达促进基因组 DNA 损伤修复\*

杨磊, 穆红, 谢莉丽<sup>△</sup>

(天津市第一中心医院检验科, 天津 300192)

**摘要:**目的 通过研究 miR-301b、C 末端结合蛋白作用蛋白(Ctip)基因表达在 DNA 损伤修复过程中的作用以及 miR-301b 影响 Ctip 基因表达的作用机制,揭示宫颈癌细胞修复 DNA 损伤的新机制。方法 (1)Siha 细胞经肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )处理、miR-301b 模拟物、抑制物转染以及 pcDNA3.1/Ctip 与 miR-301b 模拟物共转染后,利用流式细胞术检测平台和彗星实验测定细胞内 DNA 损伤标志物  $\gamma$ -H2AX 蛋白平均表达水平和 DNA 彗星状尾距;(2)采用实时定量聚合酶链式反应(PCR)检测 DNA 损伤修复过程中细胞内 miR-301b、Ctip mRNA 的水平以及转染 miR-301b 模拟物、抑制物后细胞内 Ctip mRNA 的水平;(3)采用 Western-blot 蛋白印迹试验检测转染 miR-301b 模拟物、抑制物后细胞内 Ctip 蛋白的水平;(4)应用生物信息学预测 miR-301b 在 Ctip mRNA 上的靶定位点;(5)应用荧光报告实验检测转染 miR-301b 模拟物、抑制物后细胞内 mRNA 上存在 miR-301b 靶定位点的报告基因的表达水平。结果 (1)与对照相比,刺激 1.5 和 3 h 后,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )使细胞内  $\gamma$ -H2AX 蛋白平均水平和 DNA 平均尾距升高,刺激 6 h 后,TNF- $\alpha$  对胞内  $\gamma$ -H2AX 蛋白平均水平以及 DNA 平均尾距无影响;转染 miR-301b 模拟物升高  $\gamma$ -H2AX 蛋白平均水平和 DNA 尾距,转染 miR-301b 抑制物降低  $\gamma$ -H2AX 蛋白平均水平和 DNA 平均尾距;与 miR-301b 模拟物共转染的 pcDNA3.1/Ctip 降低细胞内  $\gamma$ -H2AX 蛋白平均水平和 DNA 平均尾距;(2)TNF- $\alpha$  刺激使细胞内 miR-301b 水平降低,Ctip mRNA 水平升高;转染 miR-301b 模拟物降低 Ctip mRNA 水平,转染 miR-301b 抑制物升高 Ctip mRNA 水平;(3)转染 miR-301b 模拟物降低 Ctip 蛋白水平,转染 miR-301b 抑制物升高 Ctip 蛋白水平;(4)miR-301b 靶定 Ctip mRNA 的 3208 至 3214 核苷酸位点;(5)mRNA 上存在 miR-301b 靶定位点的报告基因的表达水平在 miR-301b 模拟物转染后降低,在 miR-301b 抑制物转染后升高。结论 Siha 细胞通过下调 miR-301b 表达增强 Ctip 基因表达促进基因组 DNA 的损伤修复。

**关键词:**宫颈癌; miR-301b; C 末端结合蛋白作用蛋白; DNA 损伤修复

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.11.002

**中图法分类号:**R737.3

**文章编号:**1673-4130(2019)11-1286-07

**文献标识码:**A

**Promotion of repair of genomic DNA damage by down-regulating the expression of miR-301b in cervical cancer cells\***

YANG Lei, MU Hong, XIE Lili<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

**Abstract: Objective** To uncover a novel pathway which was involved in the DNA damage repair on the basis of studying the roles of the expressions of miR-301b and C-terminal binding protein interacting protein (Ctip) genes in the DNA damage repairs and the impacts of miR-301bs on the Ctip gene expressions and the mechanism underlying the actions of miR-301bs. **Methods** (1) After Siha cells treated with tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), transfected with miR-301b mimics or inhibitors and cotransfected with pcDNA3.1/Ctip and miR-301b mimics, the average expression levels of  $\gamma$ -H2AX proteins and oliver tail moments of DNA indicating the damage in DNA in the cells were measured on the flowcytometry system and in comet assays. (2) The levels of miR-301bs and Ctip mRNAs in the cells which underwent DNA damage repairs and that of Ctip mRNAs in the cells transfected with miR-301b mimics or inhibitors were determined in quantitative real-time PCR assays. (3) The levels of Ctip proteins in the cells transfected with miR-301b mimics or inhibitors were detected.

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81602403)。

作者简介:杨磊,男,主管技师,主要从事分子生物学研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: xll300192@126.com。

本文引用格式:杨磊,穆红,谢莉丽. 宫颈癌细胞通过下调 miR-301b 表达促进基因组 DNA 损伤修复[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40

ted in Westernblot assays. (4) Bioinformatic tools were utilized to find out the potential targeted sites of miR-301b on the Ctip mRNA. (5) The expression levels of the report genes whose mRNAs contain the miR-301b targeted sites in cells were measured in fluorescence report assays. **Results** (1) When compared with controls, TNF- $\alpha$  made the levels of  $\gamma$ -H2AX proteins and DNA oliver tail moments increased in the cells which were incubated with TNF- $\alpha$  for 1.5 and 3 hours but no changes in the levels of  $\gamma$ -H2AX proteins and oliver tail moments were found in the cells which incubated with TNF- $\alpha$  for 6 hours. The transfections of miR-301b mimics increased the levels of  $\gamma$ -H2AX proteins and DNA oliver tail moments while the transfections of miR-301b inhibitors decreased the levels and oliver tail moments. (2) TNF- $\alpha$  administrations reduced the miR-301b levels but elevated the Ctip mRNA levels in the cells, and the transfections of miR-301b mimics resulted in the reductions in the levels of Ctip mRNAs while the transfections of inhibitors led to the increases in the levels. (3) The transfections of miR-301b mimics induced the decreases in the levels of Ctip proteins while the transfections of inhibitors caused the augments in the levels. (4) MiR-301b targeted the sequence located at positions 3208-3214 of Ctip mRNA. (5) The expression levels of report genes whose mRNAs containing miR-301b targeted sites were downregulated following the transfections of miR-301b mimics but upregulated following the transfections of miR-301b inhibitors. **Conclusion** Downregulation of miR-301b which causes the enhanced gene expression of Ctip contributes to the DNA damage repair in cervical cancer cells.

**Key words:** cervical cancer; miR-301b; C-terminal binding protein interacting protein; DNA damage repair

细胞的生存与基因组的完整性紧密相关,应用离子射线、氧化剂以及基因组毒性药物破坏细胞基因组 DNA 是杀伤肿瘤细胞的重要手段。然而,这些外界刺激会激活细胞内特异的信号通路启动 DNA 损伤修复反应清除外源刺激物在基因组上造成的损伤,使肿瘤细胞对治疗方法产生抵抗力<sup>[1-2]</sup>。微小 RNA (MiRNA) 是一种长度约 20 个核苷酸组成的小片段 RNA 分子,基于种子序列与靶基因 mRNA 非编码区的特异性结合,在 Ago 蛋白复合物加工元件的作用下,实现靶基因 mRNA 的快速降解以及蛋白的翻译阻滞,降低靶基因在细胞内的水平,进而影响细胞表型<sup>[3-4]</sup>。近期报道显示, microRNA 分子通过调控靶基因的表达参与了细胞中基因组 DNA 的损伤修复过程。E3 泛素化蛋白连接酶 (Ndfip1) 和蛋白磷酸酶调控亚基 B' $\alpha$  (PPP2R5A) 具有修复 DNA、维持 DNA 稳定性的功能,在神经胶质瘤细胞中过表达 miR-388-5p 可以干扰上述 2 种蛋白分子的表达,进而干扰细胞修复 DNA 损伤<sup>[5]</sup>。在前列腺癌细胞中, miR-890 和 miR-744-3p 分别通过抑制有丝分裂静息蛋白缺陷 2 样蛋白 2 (MAD2L2) 和 Rad23 核剪切修复蛋白同源物 B (Rad23B) 阻碍离子辐射诱导性 DNA 损伤修复过程<sup>[6]</sup>。MiR-301b 基因位点位于人类第 22 条染色短臂 1 区 2 带,该基因首先转录加工成长度为 78 bp 的发卡状前体 RNA 分子,进一步加工后形成成熟体非编码 RNA miR-301b。MiR-301b 在细胞增殖、侵袭以及凋亡等细胞生命活动中都发挥着重要作用<sup>[7-9]</sup>。C 末端结合蛋白作用蛋白 (Ctip) 基因位点位于人类第 18 条染色体短臂 1 区 2 带,其表达产物是一种内源性核酸内切酶,可以特异性识别和结合分叉 DNA 分子

的 5' 端折叠结构,与 Mre11 双链断裂修复核酶、Rad50 重组酶和 Nbs1 烟草花叶病毒抗性 N 样蛋白结合后以同源重组 (HR) 的形式修复损伤 DNA 分子<sup>[10-11]</sup>。新辅助化疗联合放射治疗是目前治疗宫颈癌的常用手段,在治疗中,化学药物通过诱导 DNA 损伤、抑制细胞分裂增殖、促进细胞凋亡的方式杀伤癌细胞。但细胞中存在参与 DNA 修复的生物分子,这些分子阻碍了化学药物对细胞的杀伤作用<sup>[12]</sup>。因此,揭示宫颈癌细胞中 DNA 修复机制,可以为探索干扰 DNA 损伤修复的方法奠定基础,最终为克服宫颈癌细胞耐药性及疾病治疗提供帮助。在本项研究中,笔者探讨了 miR-301b 与 Ctip 基因表达的作用关系及其机制、以及这种作用关系对基因组 DNA 损伤修复过程的影响,并以此为基础提出了宫颈癌细胞修复 DNA 损伤的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 宫颈癌细胞株 Siha 购自于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

### 1.2 仪器与试剂

**1.2.1 仪器** EnSpire Multilabel Reader 酶标仪,芬兰 PerkinElmer 公司; Alpha Innotech FluroChem FC2 凝胶成像分析系统,美国 Alpha Innotech 公司; LightCycle96 荧光定量 PCR 仪,瑞士 Roche 公司; BD Accuri C6 Plus 流式细胞仪,美国 BD Sciences 公司。

**1.2.2 试剂** miR-301b 模拟物、miR-301b 抑制物以及阴性对照核酸 N. C. 和抑制物 N. C. 由苏州吉玛基因股份有限公司合成;质粒构建、实时定量聚合酶链反应实验中用到逆转录、实时定量聚合酶链反应 (PCR) 扩增引物均由北京天润奥科生物科技有限公

司合成;RNA/DNA X-fect 转染试剂、PrimeScript™ 逆转录酶以及 SYBR Premix Ex Taq II 荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 Takara 生物技术有限公司;兔抗人 Ctip、GADPH 抗体以及 HRP 标记羊抗兔 IgG Fc 抗体购自美国 Proteintech 公司;鼠抗人  $\gamma$ -H2AX 蛋白抗体及 Alexa Fluor® 488 dye 标记兔抗鼠抗体购自美国 Abcam 有限公司;mirVana RNA 提取试剂盒来源于美国 Ambion 公司;Annexin-V 凋亡检测试剂盒来源于美国 BD Sciences 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 质粒构建** 本项目构建的质粒包括靶基因过表达质粒 pcDNA3.1/Ctip; 荧光报告质粒 pcDNA3.1/EGFP-Ctip-wtUTR 和 pcDNA3.1/EGFP-Ctip-mutUTR。质粒构建时逆转录条件:42 °C, 1 h, 70 °C, 15 min; PCR 扩增条件:94 °C, 2 min; 94 °C, 30 s, 57 °C, 30 s, 72 °C, 3 min, 32 个循环; 72 °C, 10 min; UTR 核酸模拟物退火条件:100 °C, 5 min, 水浴缓慢降至 37 °C。寡核苷酸引物序列请见表 1。

表 1 实验中用到的寡核苷酸片段

名称	序列
Ctip 逆转录引物	5'-TGT TTC TGT TTC AAC GTC T-3'
Ctip 一次上游扩增引物	5'-CCG CCA CCA TGG ACA TCT CGG GAA G-3'
Ctip 一次下游扩增引物	5'-TCC TGG CTC GTC ACT ATG TCT TCT GCT CCT TG-3'
Ctip 二次上游扩增引物	5'-TGG GGT ACC GCC GCC ACC ATG G-3'
Ctip 二次下游扩增引物	5'-CGG GAT CCC GCC TGG CTC GTC ACT AT-3'
UTR 野生型上游核酸	5'-GAT CCC GCT TTC ATT TTG CAC TCT AAC TTA AGC-3'
UTR 野生型下游核酸	5'-TCG AGC TTA AGT TAG AGT GCA AAA TGA AAG CGG-3'
UTR 突变型上游核酸	5'-GAT CCC GCT TTC ATT TAG GAG TCT AAC TTA AGC-3'
UTR 突变型下游核酸	5'-TCG AGC TTA AGT TAG TGA GGA AAA TGA AAG CGG-3'

注:5', 3' 分别代表核酸片段的 5' 和 3' 末端

**1.3.2 细胞培养及转染** 将细胞在含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素双抗的 1640 细胞培养液, 于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养, 将细胞以约 5 × 10<sup>4</sup> 个/毫升的密度种于培养板, 待细胞贴壁后, 用 RNA/DNA X-fect™ 转染试剂将寡核苷酸 miR-301b 模拟物、miR-301b 抑制物、N. C. 抑制物 N. C. 以及质粒 pcDNA3.1/Ctip、pcDNA3.1/EGFP-Ctip-wtUTR 和 pcDNA3.1/EGFP-Ctip-mutUTR 转染至细胞。

**1.3.3 细胞药物刺激** 将 TNF- $\alpha$  粉末溶解于磷酸缓冲液(PBS)中制备成 200  $\mu$ g/mL 的药物原液, 置于 -80 °C 条件下储存。用时取一定体积的药物原液加入至细胞培养液, 稀释成 100 ng/mL 的工作液刺激细胞 1.5、3 和 6 h。

**1.3.4 实时定量聚合酶链式(PCR)反应** 对目标基因 miR-301b、Ctip mRNA 以及内参基因 U6 小 RNA、 $\beta$ -actin mRNA 的进行荧光半定量, 反应条件: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 10 s, 60 °C 15 s, 72 °C 15 s, 扩增 35 个循环后进行熔解曲线分析并应用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法, 按公式:  $Folds = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $\Delta\Delta Ct = (Ct1 - Ct2) - (Ct3 - Ct4)$ , 其中 Ct1 为处理样品中待测基因(miR-301b 和 Ctip)的临界循环数, Ct2 为处理样品中待测基因对应的内参基因(U6 和  $\beta$ -actin)的临界循环数, Ct3 为对照样品中待测基因的临界循环数, Ct4 为对照样品中待测基因对应的内参基因的临界循环数, 计算出每

组细胞中目标基因的相对表达水平。寡核苷酸引物序列请见表 2。

**1.3.5 Western-blot 蛋白印迹实验** 对目的 Ctip 蛋白及其内参蛋白 GADPH 进行电泳分离、抗体标记及化学显影步骤。实验条件: 上样量, 25  $\mu$ g 每孔; 转膜电流及时间, 260 mA、2 h; 抗体加入量, 1 : 500 (1 抗)、1 : 2 000 (2 抗); 抗体孵育时间, 1 h (1 抗)、2 h (2 抗)。影像捕捉后, 根据目的样本灰度值(目的蛋白条带亮度-背景值)与对应内参蛋白灰度值(内参蛋白 GADPH 条带亮度-背景值)的比值, 得到目的蛋白的相对表达量。

**1.3.6  $\gamma$ -H2AX 免疫荧光实验** 灭活固定细胞后, 用磷酸化 H2AX 蛋白抗体标记细胞内的靶蛋白、流式细胞术检测靶蛋白荧光强度。实验条件: 1% 甲醛细胞灭活 15 min; 70% 乙醇细胞固定 3 h; 抗体加入量, 1 : 100 (1 抗)、1 : 100 (2 抗); 抗体孵育时间, 2 h (1 抗)、30 min (2 抗); 流式细胞采集量, 10 000 个。在研究中, 依据药物处理条件、转染寡核苷酸、质粒种类不同, 每个实验组都对应着各自对照组。对应关系如下: 磷酸盐缓冲液对照组与 TNF- $\alpha$  处理实验组; N. C. 转染对照组与 miR-301b 模拟物转染实验组; 抑制物 N. C. 转染对照组与抑制物转染实验组; pcDNA3.1 与 miR-301b 模拟物共转染对照组与 pcDNA3.1/Ctip 与 miR-301b 模拟物共转染实验组。实验组和对照组细胞经抗体标记后, 可以直接在流式细胞术平台上进行

检测,上样检测后,各组细胞群的  $\gamma$ -H2AX 蛋白的平均荧光强度会显示在平台上,每组细胞各做 3 个平行样。

**1.3.7 彗星实验** 将 400 mL 含有 8 000 个细胞的磷酸盐缓冲液与 1.2 mL 1% 的低熔点琼脂糖凝胶混合,平铺在载玻片上。胶凝固后,将载玻片置于裂解液(2%肌氨酰,0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠,0.5 mg/mL 蛋白酶 K)中 37 °C 孵育过夜。用电泳液(90

mmol/L 三羟基氨基甲烷,90 mmol/L 硼酸,2 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠)浸洗载玻片 3 次,每次 20 min。浸洗后,在电压为 14 V 的条件下,电泳 25 min。用浓度为 2.5  $\mu$ g/mL 的溴化乙锭水溶液浸泡载玻片 20 min。染色后,用 400 mL 去离子水浸洗载玻片 20 min。然后在荧光显微镜下进行观察和拍照。利用彗星实验成像工程软件(CASP)计算 DNA 尾距,每个实验组计算 50 个 DNA 尾距。

表 2 实时定量聚合酶链式反应用到的引物序列

名称	序列
MiR301b 逆转录引物	5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC TGC ACT GGA TAC GAC GCT TTG-3'
MiR301b 检测上游引物	5'-CAG TGC AAT GAT ATT GTC AAA GC-3'
MiR301b 检测下游引物	5'-TGC AAT GAT GAA AGG GCA T-3'
U6 逆转录引物	5'-TCA CGA ATT TGC GTG T-3'
U6 检测上游引物	5'-CGC TTC GGC AGC ACA T-3'
U6 检测下游引物	5'-ATT TGC GTG TCA TCC TTG C-3'
Ctip 逆转录引物	5'-TGT TTC TGT TTC AAC GTC T-3'
Ctip 检测上游引物	5'-GCC ACA GGC TCC CAG ACA T-3'
Ctip 检测下游引物	5'-GCA GGA AAT CCC ATA GCA ATA AT-3'
$\beta$ -actin 逆转录引物	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'
$\beta$ -actin 检测上游引物	5'-AGT TGC GTT ACA CCC TTT CTT G-3'
$\beta$ -actin 检测下游引物	5'-TGT CAC CTT CAC CGT TCC AGT-3'

注:5'、3'分别代表核酸片段的 5'和 3'末端

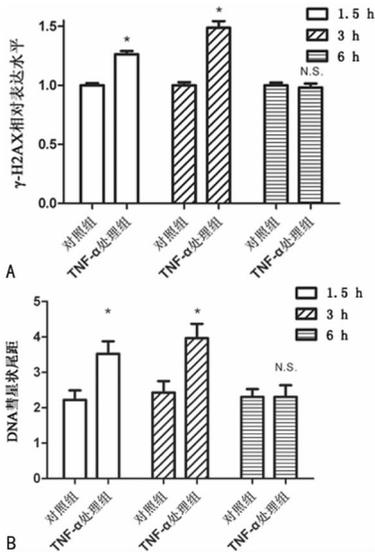
**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计学分析,计数资料以百分数或率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 宫颈癌 Siha 细胞修复基因组 DNA 损伤的分析** 用 TNF- $\alpha$  试剂(处理组)和等体积的磷酸盐缓冲液(对照组)作用 Siha 细胞后,测定各组细胞内  $\gamma$ -H2AX 表达的平均水平以及 DNA 彗星状平均尾距,监测胞内 DNA 损伤程度。与对照组细胞相比,TNF- $\alpha$  处理组细胞经药物刺激 1.5 和 3 h 后,胞内  $\gamma$ -H2AX 蛋白平均表达水平分别上升了 0.26 和 0.48 倍,同时平均尾距增加了 0.58 和 0.96 倍( $P < 0.05$ ),而药物刺激细胞 6 h 后,TNF- $\alpha$  处理组细胞中的  $\gamma$ -H2AX 蛋白平均表达水平以及平均尾距与对照组相比无明显差异(图 1A 和 B)。

**2.2 miR-301b 模拟物、miR-301b 抑制物对宫颈癌细胞中 Ctip 基因表达的影响** 应用 PCR 实验分别检测 TNF- $\alpha$  处理组和对照组细胞中 miR-301b、Ctip mRNA 相对表达水平。在药物刺激 1.5 和 3 h 后,与对照组相比,TNF- $\alpha$  处理组细胞中 miR-301b 表达水平分别下降了 25.33% 和 38.63% ( $P < 0.05$ ) (图 2),同时 Ctip mRNA 的水平分别上升了 0.19 和 0.37 倍 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。分别转染 miR-301b 模拟物(miR-

301b 模拟物组)、miR-301b 阴性对照核酸 N. C. (N. C. 组)、miR-301b 抑制物(抑制物组)以及抑制物对照核酸抑制物 N. C. (抑制物 N. C. 组)至细胞,应用 PCR 和 Western-blot 实验检测各组细胞中 Ctip mRNA 和蛋白表达水平。与 N. C. 组细胞相比,miR-301b 组细胞中 Ctip mRNA 和蛋白表达水平分别下降 44.60% 和 30.53% ( $P < 0.05$ );与抑制物 N. C. 组细胞相比,抑制物组细胞中 Ctip mRNA 和蛋白水平分别上升 0.34 和 0.27 倍 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。TargetScanHuman、miRBD、DIANA TOOL 以及 Pictar 4 种生物信息学软件预测结果显示,Ctip mRNA 上 3208 至 3214 核苷酸位点的核酸序列与 miR-301b 的 2 到 8 核苷酸位点的种子序列反向互补,是 miR-301b 潜在的靶定位点(图 5);荧光报告实验结果显示,与 N. C. 组细胞相比,嵌合有野生型 Ctip mRNA 3'UTR 的报告载体(pcDNA3.1/EGFP-Ctip-wtUTR)上的绿色荧光蛋白报告基因在 miR-301b 模拟物组细胞中的表达水平下降 19.53% ( $P < 0.05$ );与抑制物 N. C. 组细胞相比,报告基因在抑制物组细胞中的表达水平上升 0.15 倍 ( $P < 0.05$ );然而嵌有突变型 3'UTR 载体(pcDNA3.1/EGFP-Ctip-mutUTR)上的报告基因表达水平在上述各组细胞中的表达水平无明显差异(图 6)。



注:A为TNF-α刺激对γ-H2AX蛋白水平的影响;B为TNF-α刺激对DNA彗星状尾距的影响

图1 TNF-α刺激对γ-H2AX蛋白水平和DNA彗星状尾距的影响

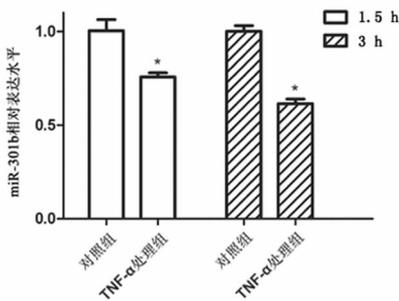


图2 TNF-α刺激对miR-301b表达水平的影响

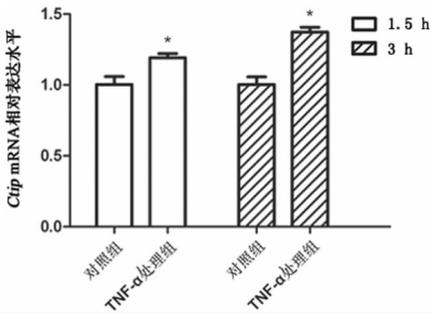


图3 TNF-α刺激对Ctip mRNA表达水平的影响

**2.3 miR-301b对宫颈癌细胞修复DNA损伤的影响** 分别向细胞转染miR-301b模拟物、miR-301b抑制物以及它们各自的阴性对照核酸N.C和抑制物N.C.后,测定各组细胞内γ-H2AX蛋白平均表达水平和DNA彗星状平均尾距。TNF-α刺激细胞6h后,与N.C.组细胞相比,miR-301b模拟物组细胞中γ-H2AX平均表达水平和平均尾距分别上升0.78倍和0.42倍( $P < 0.05$ );刺激细胞3h后,与抑制物N.C.组细胞相比,抑制物组细胞中γ-H2AX蛋白平均表达水平和平均尾距分别下降22.13%和26.09%( $P < 0.05$ )(图7A和B)。

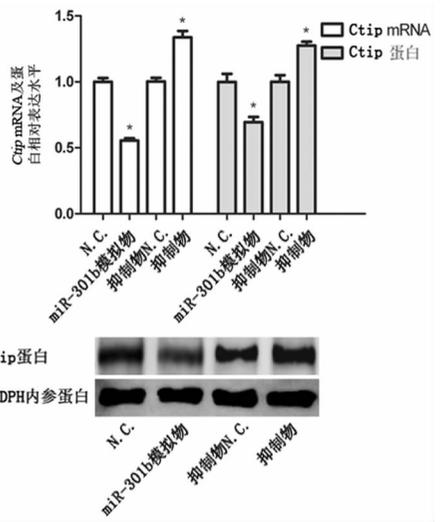


图4 转染miR-301b模拟物、抑制物对Ctip基因表达水平的影响

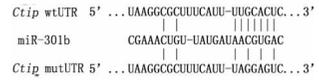


图5 miR-301b与Ctip mRNA 3'UTR及其突变体的靶定方式

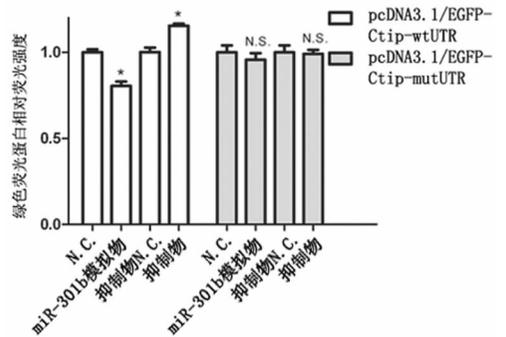
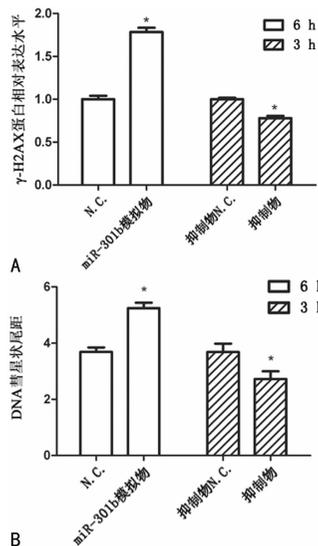


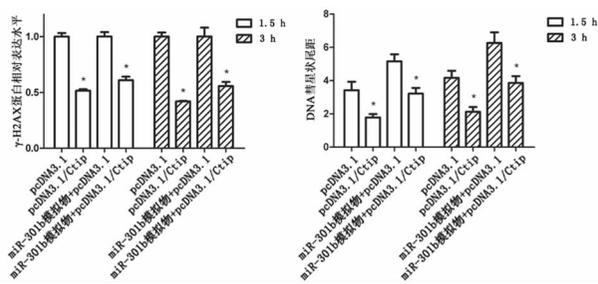
图6 miR-301b与Ctip mRNA 3'UTR及其突变体的靶定方式



注:A为转染miR-301b模拟物、抑制物对γ-H2AX蛋白表达水平的影响;B为转染miR-301b模拟物、抑制物对DNA彗星状尾距的影响

图7 转染miR-301b模拟物、抑制物对γ-H2AX蛋白表达水平和DNA彗星状尾距的影响

**2.4 Ctip 基因表达对 miR-301b 干扰宫颈癌细胞修复 DNA 损伤的影响** 分别将 pcDNA3.1/Ctip 或其对照载体 pcDNA3.1 与 miR-301b 模拟物共转染至靶细胞,测定各组细胞内  $\gamma$ -H2AX 蛋白平均表达水平和 DNA 彗星状平均尾距。TNF- $\alpha$  刺激细胞 1.5 和 3 h 后,与共转染 miR-301b 模拟物和 pcDNA3.1 的细胞相比,共转染 miR-301b 模拟物和 pcDNA3.1/Ctip 质粒的细胞中  $\gamma$ -H2AX 蛋白平均表达水平分别下降 39.02% 和 44.35%,与此同时,平均尾距分别下降 33.60% 和 38.12% ( $P < 0.05$ ) (图 8A 和 B)。



注: A 为过表达 Ctip 基因对 miR-301b 模拟物转染组细胞中  $\gamma$ -H2AX 蛋白表达水平的影响; B 为过表达 Ctip 基因对 miR-301b 模拟物转染组细胞中彗星状 DNA 尾距的影响

图 8 过表达 Ctip 基因对 miR-301b 模拟物转染组细胞中  $\gamma$ -H2AX 蛋白表达水平和彗星状 DNA 尾距的影响

### 3 讨 论

TNF- $\alpha$  是一种相对分子质量为  $26 \times 10^3$  的跨膜蛋白,经金属转换酶的作用后,可由跨膜型蛋白转换为可溶性型细胞因子,在不同的炎症反应中发挥重要作用<sup>[13]</sup>。TNF- $\alpha$  处理细胞后,会使细胞线粒体内产生大量胞内活性氧中间分子(ROI),这些分子经金属离子催化后能形成具有强氧化活性的羟基自由基,产生的这些自由基可以通过氧化反应氧化 DNA 分子中核苷酸,造成 DNA 损伤<sup>[14-15]</sup>。文献记录显示,用浓度为 1、10 和 100 ng/mL 的 TNF- $\alpha$  试剂处理淋巴细胞 1 h 后,细胞内 DNA 损伤标志物的水平即可出现显著升高,而药物处理 4 h 后,损伤标志物水平出现下降。在药物处理 24 h 后,浓度为 1、10 ng/mL TNF- $\alpha$  试剂造成标志物水平升高的现象消失,100 ng/mL TNF- $\alpha$  试剂造成标志物水平升高的现象仍存在。这些文献中报道的数据说明 2 个问题:(1)TNF- $\alpha$  处理细胞后能够诱发 DNA 损伤修复反应;(2)100 ng/mL TNF- $\alpha$  试剂对细胞 DNA 损伤作用更持久<sup>[16]</sup>。目前还没有利用 TNF- $\alpha$  试剂诱导宫颈癌细胞 DNA 损伤修复反应的文献记录,因此,本研究依据现有文献报道,将 TNF- $\alpha$  试剂浓度设定为 100 ng/mL,分别在药物处理后,1.5、3 h 2 个时间点观察 DNA 损伤标志物的水平确定 TNF- $\alpha$  能否造成宫颈癌细胞中 DNA 的损伤,6、24 h 2 个时间点观察损伤标志物的水平确定 TNF- $\alpha$  诱导性 DNA 损伤可否被宫颈癌细胞修复。本研究的实验结果显示,与对照组细胞相比,用 TNF- $\alpha$  刺激 Si-

ha 细胞 1.5 和 3 h 后,细胞中的 DNA 损伤标记物  $\gamma$ -H2AX 蛋白的平均表达水平以及 DNA 彗星状平均尾距均出现明显升高,然而当 TNF- $\alpha$  刺激时间延长至 6 h, $\gamma$ -H2AX 蛋白平均表达水平及 DNA 平均尾距却未出现显著差异。这说明 TNF- $\alpha$  可以造成 Siha 细胞内基因组 DNA 的损伤,但该损伤在 6 h 内就可以被细胞完全修复。TNF- $\alpha$  刺激造成了 miR-301b 的上升和 Ctip mRNA 水平的下降。为探索 miR-301b 和 Ctip mRNA 表达水平变化之间有无关联,笔者利用转染技术,对 TNF- $\alpha$  处理细胞进行了信号通路干预。与相应对照核酸相比,转染 miR-301b 模拟物会导致 Ctip mRNA 和蛋白水平的降低,而转染 miR-301b 抑制物会使 Ctip mRNA 和蛋白水平升高。该结果说明,miR-301b 可能影响 Ctip 基因表达。生物信息学分析预测出了 Ctip mRNA 3'UTR 上 miR-301b 的靶定位点。与相应对照组细胞相比,pcDNA3.1/EGFP-Ctip-wtUTR 载体上报告基因的表达强度在 miR-301b 模拟物组细胞中显著降低、在抑制物组细胞中明显升高;而 pcDNA3.1/EGFP-Ctip-mutUTR 载体上报告基因表达强度在上述两组细胞中无显著变化。这些说明,miR-301b 是通过直接结合 Ctip mRNA 3'UTR 上预测出的靶定位点来抑制 Ctip 基因表达的。TNF- $\alpha$  作用后,细胞内 miR-301b、Ctip mRNA 表达水平的变化说明这两种分子可能参与了基因组 DNA 的损伤修复过程。此外,该基因产物还可以通过微同源介导末端连接的方式(MMEJ)完成损伤 DNA 分子的修复<sup>[17]</sup>。因此,miR-301b 对 Ctip 基因表达的调控可能会影响细胞中 DNA 损伤修复过程。与相应对照组细胞相比,miR-301b 模拟物组细胞中  $\gamma$ -H2AX 蛋白平均表达水平以及 DNA 彗星状平均尾距的上升以及抑制物组细胞中  $\gamma$ -H2AX 蛋白平均表达水平和平均尾距的下降说明 miR-301b 会干扰 DNA 的损伤修复。而与转染 pcDNA3.1 的细胞相比,pcDNA3.1/Ctip 质粒与 miR-301b 模拟物共转染导致细胞内  $\gamma$ -H2AX 蛋白平均表达水平下降则说明 miR-301b 可通过抑制 Ctip 基因表达干扰 DNA 的损伤修复。

### 4 结 论

宫颈癌 Siha 细胞通过下调 miR-301b 增强 Ctip 基因表达促进基因组 DNA 的损伤修复。

### 参考文献

[1] JACKSON S P, J. Bartek. the DNA-damage response in human biology and disease[J]. Nature, 2009, 461(7267): 1071-1078.  
 [2] TIAN H, GAO Z, LI H, et al. DNA damage response--a double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy[J]. Cancer Lett, 2015, 358(1): 8-16.  
 [3] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.

- [4] FARH K K, GRIMSON A, JAN C, et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*[J]. *Science*, 2005, 310(5755):1817-1821.
- [5] BESSE A, SANA J, LAKOMY R, et al. MiR-338-5p sensitizes glioblastoma cells to radiation through regulation of genes involved in DNA damage response[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(6):7719-7727.
- [6] HATANO K, KUMAR B, ZHANG Y, et al. A functional screen identifies miRNAs that inhibit DNA repair and sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(8):4075-4086.
- [7] YAN L, WANG Y, LIANG J, et al. MiR-301b promotes the proliferation, mobility, and epithelial-to-mesenchymal transition of bladder cancer cells by targeting EGR1[J]. *Biochem Cell Biol*, 2017, 95(5):571-577.
- [8] WU D G, CHEN B S, CUI F, et al. Hypoxia-induced microRNA-301b regulates apoptosis by targeting Bim in lung cancer[J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(4):476-483.
- [9] XIANG S J, CHEN H J, LUO X J, et al. Isoliquiritigenin suppresses human melanoma growth by targeting miR-301b/LRIG1 signaling[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):184.
- [10] MAKHARASHVILI N, TUBBS A T, YANG S H, et al. Catalytic and noncatalytic roles of the CtIP endonuclease in Double-Strand break end resection[J]. *Mol Cell*, 2014, 54(6):1022-1033.
- [11] SARTORI A A, LUKAS C, COATES J, et al. Human CtIP promotes DNA end resection[J]. *Nature*, 2007, 450(7169):506-509.
- [12] REAL N E, CASTRO G N, DARIO C F, et al. Molecular markers of DNA damage and repair in cervical cancer patients treated with cisplatin neoadjuvant chemotherapy: an exploratory study[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2017, 22(6):811-822.
- [13] BEMELMANS M H, BUURMAN W A. Tumor necrosis factor; function, release and clearance[J]. *Crit Rev Immunol*, 1996, 16(1):1-11.
- [14] WHEELHOUSE N M, CHAN Y S, GILLIES S E, et al. TNF-alpha induced DNA damage in primary murine hepatocytes[J]. *Int J Mol Med*, 2003, 12(6):889-894.
- [15] SHOJI Y, UEDONO Y, ISHIKURA H, et al. DNA damage induced by tumour necrosis factor-alpha in L929 cells is mediated by mitochondrial Oxygen radical formation [J]. *Immunology*, 1995, 84(4):543-548.
- [16] WESTBROOK A M, WEI BO, HACKE K, et al. The role of tumour necrosis factor- $\alpha$  and tumour necrosis factor receptor signalling in inflammation-associated systemic genotoxicity[J]. *Mutagenesis*, 2012, 27(1):77-86.
- [17] YUN M H, HIOM K. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle[J]. *Nature*, 2009, 459(7245):460-U184.

(收稿日期:2018-11-02 修回日期:2019-01-10)

(上接第 1285 页)

- Nonmuscle myosin heavy chain II A mediates Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal epithelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2015, 112(35):11036-11041.
- [9] LAN K, VERMA S C, MURAKAMI M, et al. Epstein - Barr Virus (EBV): infection, propagation, quantitation, and storage[J]. *Curr Protoc Microbiol*, 2017, 6(1):14E. 2. 1-14E. 2. 21.
- [10] 熊丹, 许晓清, 阚丽娟, 等. 膜蛋白 NMHC II A 的表达对膀胱癌细胞侵袭和转移的影响[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(11):1281-1285.
- [11] VEETIL M V, SADAGOPAN S, KERUR N, et al. Interaction of c-Cbl with myosin II A regulates Bleb associated macropinocytosis of Kaposi' s sarcoma-associated herpesvirus [J]. *PLoS pathogens*, 2010, 6(12):e1001238.
- [12] ARII J, GOTO H, SUENAGA T, et al. Non-muscle myosin II A is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1 [J]. *Nature*, 2010, 467(7317):859-862.
- [13] LIA L L, XUE B Y, SUN W Y, et al. Recombinant MYH9 protein C-terminal domain blocks porcine reproductive and respiratory syndrome virus internalization by direct interaction with viral glycoprotein 5 [J]. *Antiviral Res*, 2018, 156:10-20.
- [14] YE G, HUANG K, YU J, et al. MicroRNA-647 targets SRF-MYH9 axis to suppress invasion and metastasis of gastric cancer [J]. *Theranostics*, 2017, 7(13):3338-3353.
- [15] WANG Y, HE H, LI W, et al. MYH9 binds to lncRNA gene PTCSC2 and regulates FOXE1 in the 9q22 thyroid cancer risk locus [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2017, 114(3):474-479.
- [16] LI F, SHI J, XU Z, et al. S100A4-MYH9 axis promote migration and invasion of gastric cancer cells by inducing TGF- $\beta$ -Mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Cancer*, 2018, 9(21):3839.
- [17] SCHRAMEK D, SENDOEL A, SEGAL J P, et al. Direct in vivo RNAi screen unveils myosin II a as a tumor suppressor of squamous cell carcinomas [J]. *Science*, 2014, 343(6168):309-313.
- [18] LAURA E N, YA R W, JOHN S C, et al. Myosin-II A heavy chain phosphorylation on S1943 regulates tumor metastasis[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 370(2):273-282.

(收稿日期:2018-11-04 修回日期:2019-01-12)