

## 微小 RNA-218 对耐顺铂宫颈癌细胞生物学特性影响的研究\*

邵琼<sup>1</sup>, 苏瑞芬<sup>2</sup>, 许海<sup>3△</sup>

(1. 湖北省来凤县人民医院妇产科, 湖北恩施 445700; 2. 湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院妇产科, 湖北恩施 445000; 3. 湖北中医药大学黄家湖医院妇科, 湖北武汉 430070)

**摘要:**目的 研究和探讨微小 RNA-218(miR-218)对耐顺铂宫颈癌细胞的增殖克隆、迁移侵袭能力、药物敏感性等特性的影响。方法 以人宫颈癌细胞株 SiHa 细胞系为亲本株细胞,采用低浓度加量持续诱导法产生耐顺铂 SiHa 细胞株(耐顺铂 SiHa),以慢病毒为载体构建过表达 miR-218 的耐顺铂细胞株(miR-218/耐顺铂 SiHa)。通过荧光定量 PCR 检测转染后 miR-218/耐顺铂 SiHa 的 miR-218 表达情况。采用 MTT 法检测 SiHa、耐顺铂 SiHa、miR-218/耐顺铂 SiHa 3 组细胞在含顺铂培养液的增殖克隆及顺铂半数有效抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。划痕试验和 Transwell 法检测 3 组细胞的迁移和侵袭能力。结果 成功构建了耐顺铂 SiHa 及 miR-218/耐顺铂 SiHa 细胞株,与 SiHa 及耐顺铂 SiHa 组比较,miR-218/耐顺铂 SiHa 组的 miR-218 表达量显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在含有顺铂培养液中,耐顺铂 SiHa 组的克隆增殖与 IC<sub>50</sub> 显著高于 SiHa 组与 miR-218/耐顺铂 SiHa 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),SiHa 组与 miR-218/耐顺铂 SiHa 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),miR-218/耐顺铂 SiHa 组的划痕愈合率与细胞穿膜次数显著低于 SiHa 组及耐顺铂 SiHa 组,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 过表达 miR-218 可以显著抑制宫颈癌细胞增殖与侵袭能力,增强对顺铂的药物敏感性,对耐药病例的治疗提供新的思路。

关键词:微小 RNA; SiHa 细胞; 宫颈癌; 顺铂

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.15.002

中图法分类号:R737.33

文章编号:1673-4130(2019)15-1798-04

文献标识码:A

## Effect of microRNA-218 on the biological characteristics of cisplatin-resistant cervical cancer cells\*

SHAO Qiong<sup>1</sup>, SU Rui fen<sup>2</sup>, XU Hai<sup>3△</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology of Laifeng County Central Hospital, Enshi, Hubei 445700, China; 2. Department of Obstetrics and gynecology in Enshi Central Hospital, Enshi, Hubei 44500, China; 3. Department of Gynaecology, Huangjiahu Hospital of Hu Bei Traditional Chinses Medicine University, Wuhan, Hubei 430000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of microRNA-218 on the proliferation, migration and drug resistance of cisplatin-resistant cervical cancer cells. **Methods** Use human cervical cancer cell line SiHa as parent cell line. Cisplatin-resistant SiHa cell line (cisplatin-resistant SiHa) was produced by continuous cisplatin induction at low concentration. Cisplatin-resistant cell line overexpressing miR-218 (miR-218/cisplatin-resistant SiHa) was constructed by using lentivirus as vector. The expression of miR-218 in SiHa, cisplatin-resistant SiHa and miR-218/cisplatin-resistant SiHa was detected by real-time PCR. MTT assay was used to detect the proliferation inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of SiHa, cisplatin-resistant SiHa, miR-218/cisplatin-SiHa cells in cisplatin-containing medium. Scratch test and Transwell method were used to detect the migration and invasion ability of the three groups of cells. **Results** The expression of miR-218 in miR-218/cisplatin-resistant SiHa group was significantly higher than that of SiHa and cisplatin-resistant SiHa group ( $P < 0.05$ ). The expression of miR-218 was significantly higher than that of SiHa group, The cell proliferation and IC<sub>50</sub> of cisplatin-resistant SiHa group were significantly higher than that of SiHa and miR-218/ cisplatin-resistant SiHa group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between SiHa and miR-218/cisplatin-resistant SiHa group ( $P > 0.05$ ), miR-218/cisplatin-resistant SiHa was significantly lower than that of SiHa and cisplatin-resistant SiHa group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** For cisplatin-resistant cervical cancer cells, overexpression of miR-

\* 基金项目:中国博士后科学基金资助项目(2013M542498);湖北省自然科学基金资助项目(2018CFC808)。

作者简介:邵琼,女,主治医师,主要从事妇产科临床及基础研究工作。△ 通信作者,E-mail:shaoqiong1977@sina.com。

本文引用格式:邵琼,苏瑞芬,许海.微小 RNA-218 对耐顺铂宫颈癌细胞生物学特性影响的研究[J].国际检验医学杂志,2019,40(15):

218 can significantly inhibit its proliferation and invasion, increase the sensitivity to cisplatin, and provide a new idea for the treatment of drug-resistant cases.

**Key words:** microRNA; SiHa cells; cervical cancer; cisplatin

宫颈癌的发病率在女性恶性肿瘤中高居第二,除手术治疗外,化疗也是重要的治疗手段之一<sup>[1]</sup>,顺铂是临床上治疗宫颈癌的一线化疗药物,但由于各种复杂的机制,相当一部分患者会因为对顺铂产生耐药性而导致化疗失败<sup>[2-3]</sup>。增加耐药细胞对顺铂的敏感性是挽救耐药病例的一个重要研究思路。研究发现微小 RNA(miRNA)在宫颈癌中表达异常<sup>[4]</sup>。microRNA 是一类非编码单链小 RNA,核苷酸长度为 18~25 个,可以通过调控活性靶点而参与肿瘤的发生<sup>[5]</sup>。其中 miRNA-218(miR-218)在宫颈癌中的表达显著降低,可能是潜在的肿瘤抑制因子<sup>[6]</sup>。目前,有关 miR-218 对于耐药宫颈癌细胞作用的研究较少。本研究建立了耐顺铂的宫颈癌细胞株,并使其过表达 miR-218,观察了耐药细胞生物学特性的改变,取得了一定的研究成果,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 人宫颈癌细胞 SiHa 细胞系购于北京中原公司;顺铂购于齐鲁制药公司;DMEM 培养基、10%胎牛血清、青霉素、链霉素、0.25%胰蛋白酶购于 Gibco 公司;慢病毒载体质粒、miRNA-218 基因片段购于上海吉玛公司;miRNA 快速提取试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 检测试剂盒购于北京天根公司。流式细胞仪为美国 BD 公司生产。Transwell 小室由美国 Corning 公司生产。

**1.2 细胞培养** 在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中加入双抗(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素),将 SiHa 细胞置于培养基中,当细胞融合率达到 80%时,用 0.25%胰蛋白酶消化、传代,于 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养,保持恒温 37  $^{\circ}\text{C}$ 。

**1.3 耐顺铂宫颈癌细胞株培养** 通过持续缓慢增加顺铂浓度的方法建立耐药细胞株<sup>[7]</sup>,在 SiHa 细胞培养液中加入 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  低浓度的顺铂,持续作用 2 周后,待细胞可在此浓度中稳定生长,再将顺铂浓度增加至 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,6 周后增加至 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,12 周后增加至 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,8 周后增加至 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,11 周后观察在培养液中仍稳定增殖的细胞株即为耐顺铂 SiHa 细胞株(耐顺铂 SiHa)。

**1.4 miR-218 过表达耐顺铂 SiHa 细胞株建立及表达检测** 将 miR-218 序列和阴性对照序列扩增并克隆到慢病毒质粒 LV3 上,miR-218 基因片段为 5'-TTG TGC TTT TGT GCT TGA TCT AAC CAT GT-3',阴性对照为 5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG TTT C-3',严格按照产品操作手册进行转染耐顺铂 SiHa 细胞,在 96 孔板中每孔加入 100  $\mu\text{L}$  完全培养基,接种耐顺铂 SiHa 细胞  $3.5 \times 10^3$ ,感染细胞病毒滴度为  $1 \times 10^7$  TU/mL,并加入 0.5 g/L 的聚凝胺,

72 h 后用荧光显微镜下观察细胞发光情况,加入 1.2 mg/L 嘌呤霉素杀死未转染细胞,筛选出的细胞即为过表达 miR-218 的耐顺铂 SiHa 细胞株(miR-218/耐顺铂 SiHa),期间根据细胞的生长状况进行传代培养。获得稳定生长表达的细胞株后,按照 miRNA 快速提取试剂盒说明严格操作,提取 SiHa、耐顺铂 SiHa、miR-218/耐顺铂 SiHa 3 组细胞的 RNA,逆转录合成 cDNA,按照逆转录试剂盒进行扩增,采用荧光定量 PCR 试剂盒检测各组细胞 miRNA-218 的表达量。

**1.5 MTT 法检测细胞在顺铂中的增殖情况** 采用 0.25%胰蛋白酶消化 SiHa、耐顺铂 SiHa、miR-218/耐顺铂 SiHa 3 组细胞,调整细胞数量,离心后接种于 96 孔板,同时采用 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的顺铂处理,采用 MTT 法测定吸光度(A)值,连续测量 7 d,根据 A 值绘制生长曲线反映细胞增殖活力。

**1.6 顺铂药物敏感性测定** 采用 0.25%胰蛋白酶消化 3 组细胞,调整细胞数量,离心后接种于 96 孔板,并分别用 0、0.000 4、0.004、0.04、0.4、4、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度顺铂处理,72 h 后采用 MTT 法测定吸光度,计算 IC<sub>50</sub>。

**1.7 划痕试验** 将细胞接种于 96 孔板中,采用 3%胎牛血清培养,待细胞汇合达 85%时,用移液枪枪头沿孔底做一直径的笔直划痕,并吹走划落细胞,分别在 0、24 h 时在 200 倍显微镜下观察和测量划痕闭合宽度。

**1.8 Transwell 法测定细胞侵袭能力** 0.25%胰蛋白酶消化 3 组细胞,调整细胞数量,使用无血清培养基重悬,在小室下室加入 10%血清培养基 600  $\mu\text{L}$ ,小室上室加入 150  $\mu\text{L}$  细胞悬液,放入 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中,恒温 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 10 h 后甲醛固定小室,结晶紫染色,底膜切片移至载玻片中性树胶封片,200 倍光镜下随机取 5 个视野计数细胞数取平均值,即为穿膜细胞数。

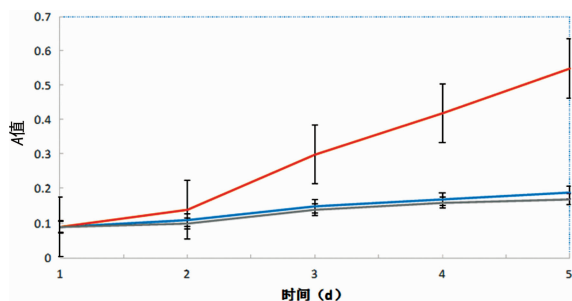
**1.9 统计学处理** 应用 SPSS19.0 分析软件,组间比较用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组细胞 miR-218 的表达量** 以 SiHa 组细胞为对照组,其 miR-218 的相对表达量为  $1.00 \pm 0.00$ 。miR-218/耐顺铂 SiHa 组细胞的 miR-218 相对表达量为  $5.26 \pm 0.34$ ,显著高于 SiHa 组( $t = 20.65, P < 0.05$ )。耐顺铂 SiHa 组细胞的相对表达量为  $1.43 \pm 0.21$ ,与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),低于 miR-218/耐顺铂 SiHa 组( $t = 18.76, P < 0.05$ )。耐药株细胞的 miR-218 表达量与亲本株差异无统计

学意义, SiHa 细胞发生耐药的过程可能无 miR-218 参与, 转染 miR-218 后表达量显著增加, 证实转染成功。

**2.2 各组细胞在顺铂中的增殖克隆及 IC<sub>50</sub>** 在含 0.4 μg/mL 的顺铂培养液中, 采用 MTT 法检测细胞增殖情况, 连续 5 d, 根据所测得的 A 值绘制生长曲线, 见图 1。在 1~2 d, 3 组细胞增殖差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 3~5 d 时, 耐顺铂 SiHa 组的增殖显著高于 miR-218/耐顺铂 SiHa 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), miR-218/耐顺铂 SiHa 组与 SiHa 组之间增殖水平比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。耐顺铂 SiHa 组的 IC<sub>50</sub> 显著高于 SiHa 组 [(0.15 ± 0.03) μg/mL] 与 miR-218/耐顺铂 SiHa 组 [(0.23 ± 0.06) μg/mL]。



注: 从上到下的三条生长曲线依次为耐顺铂 SiHa 组、SiHa 组、miR-218/耐顺铂 SiHa 组

图 1 各组细胞生长曲线

**2.3 划痕试验** 分别在 0、24 h 时在 200 倍显微镜下观察和测量划痕闭合宽度, SiHa、耐顺铂 SiHa、miR-218/耐顺铂 SiHa 组的划痕愈合率分别为 (28.16 ± 2.14)%、(29.35 ± 1.86)%、(13.45 ± 1.02)%, miR-218/耐顺铂 SiHa 组划痕愈合率显著低于 SiHa 与耐顺铂 SiHa 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

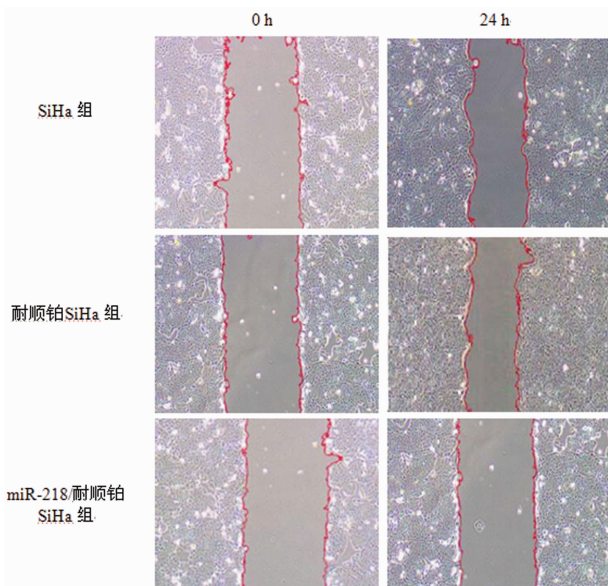


图 2 划痕试验检测各组细胞迁移能力 (200×)

**2.4 细胞侵袭能力** 200 倍光镜下观察小室底膜细胞数, SiHa、耐顺铂 SiHa、miR-218/耐顺铂 SiHa 组细

胞穿膜数分别为 123.40 ± 21.65、132.50 ± 22.32、78.90 ± 12.54, miR-218/耐顺铂 SiHa 组细胞穿膜数显著低于 SiHa 与耐顺铂 SiHa 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

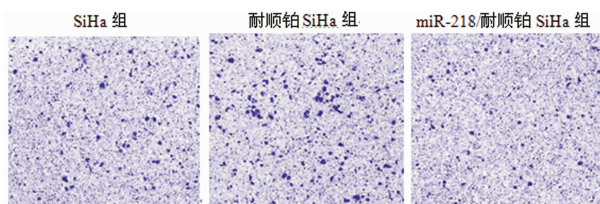


图 3 Transwell 法测定细胞侵袭能力 (200×)

### 3 讨论

从组织学分类, 宫颈癌属于鳞癌, 人宫颈鳞癌 SiHa 细胞是最常用于肿瘤研究的细胞系之一。顺铂作为宫颈癌化疗的一线药物效果显著, 但临床一旦发生耐药, 治疗效果将会受到巨大影响。宫颈癌耐药的发生可能与化疗药物进入肿瘤细胞减少或溢出增多, 药物在肿瘤细胞内活性减弱, 化疗药物作用的靶分子改变, 肿瘤 DNA 损伤修复能力增强, 肿瘤细胞凋亡抑制相关<sup>[8]</sup>。宫颈癌细胞耐药的机制尚不明确, 目前认为这些机制或多或少参与了宫颈癌耐顺铂的过程中。有学者发现耐药株细胞学形态发生了改变, 可能通过这种改变增加代谢, 增强自身修复能力<sup>[9]</sup>。建立耐药株模型, 研究增加耐药株对药物敏感性的方法具有重大科研和临床价值。耐药株的建立目前有两种方法, 一是低浓度持续加量诱导法, 优点是细胞耐药性较稳定成功率高; 另一种方法是大剂量冲击间断给药法, 优点是更接近于临床耐药发生过程。在研究了诸多文献后, 本研究采取了前者的造模方式, 经过 40 周的培养, 成功获得了耐顺铂 SiHa 细胞株。

miRNA 在癌症发生发展中发挥了重要作用, miRNA 是一类高度保守的非编码单链小分子 RNA, 可通过与多个靶基因的 mRNA 的 3' 端的非翻译区发生不完全的互补配对, 并在转录后抑制基因的表达。OLIVETO 等<sup>[10]</sup>报道, miRNA 可通过扩增表达或减少表达来实现对癌症的抑制, 几乎参与了肿瘤发生发展的每一个步骤, 在肿瘤发病机制中发挥了重要作用。50% 以上的 miRNAs 定位于肿瘤的相关基因组区域内, 并可由染色体异常而导致 miRNAs 基因拷贝数的改变, 进而出现 miRNAs 的表达失调。几乎所有的肿瘤组织内均可检测出 miRNAs 的异常表达。miR-218 在乳腺癌、肝细胞癌、神经胶质瘤等诸多恶性肿瘤中表达下降<sup>[11-13]</sup>, JIANG 等<sup>[14]</sup> 研究报道宫颈癌患者血清中 miR-218 表达量显著低于正常妇女, 崔英等<sup>[15]</sup> 发现宫颈癌组织中 miR-218 的表达量显著高于正常宫颈组织, 石玉荣等<sup>[16]</sup> 发现 miR-218 可以预测宫颈癌的侵袭性, 其高表达可能抑制宫颈癌细胞的迁移。在本研究中, 将 miR-218 基因通过慢病毒感染的方式转染入耐药 SiHa 细胞株, 通过 PCR 荧光定量检测, 发现 miR-218/耐顺铂 SiHa 细胞株中 miR-218 的

表达量显著增加,同时发现亲本株细胞与耐药株细胞的 miR-218 表达量差异无统计学意义( $P>0.05$ ),说明耐药的发生可能与 miR-218 表达量无关。在含有一定量顺铂的培养基中 miR-218/耐顺铂 SiHa 的增殖速度和  $IC_{50}$  显著低于耐药株,但与亲本株无差异,说明虽然耐药的发生过程与 miR-218 无关,但过量表达 miR-218 后可以增加耐药株细胞对顺铂的敏感性。之后的划痕试验和 Transwell 试验均证实了 miR-218 对耐药株细胞迁移和侵袭能力的抑制,这与目前大多研究结果相一致。

本研究通过持续缓慢增加顺铂浓度的方法成功构建了 SiHa 耐药株,慢病毒转染法建立了过表达 miR-218 的 SiHa 细胞株及耐药株。与 SiHa 及耐顺铂 SiHa 相比,miR-218/耐顺铂 SiHa 细胞株的 miR-218 表达量显著升高;在含有顺铂培养液中,耐顺铂 SiHa 的克隆增殖与  $IC_{50}$  显著高于 SiHa 与 miR-218/耐顺铂 SiHa,miR-218/耐顺铂 SiHa 的划痕愈合率与细胞穿膜次数显著低于 SiHa 及耐顺铂 SiHa。

#### 4 结 论

miR-218 基因可能不参与宫颈癌细胞的耐药发生,但对于已经发生耐药的宫颈癌细胞,转染 miR-218 基因后使基因过表达 miR,则可以增加对顺铂的敏感性,同时迁移和侵袭能力下降,对于临床耐药而导致化疗失败的患者而言,提供了一条新的科研和治疗思路。

#### 参考文献

[1] 唐秦,邢高升,彭君臣,等. 杉醇联合铂类方案治疗中晚期宫颈癌的疗效[J]. 热带医学杂志,2016,16(2):213-216.  
 [2] ZHU H, LUO H, ZHANG W, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer[J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10 (1):1885-1895.  
 [3] 方芳,蔡军波,王萍. 欧前胡素逆转宫颈癌细胞对顺铂的抵抗性及机制研究[J]. 浙江实用医学,2016,21 (6):391-393.  
 [4] 沈小姣,于波,秦晓蕾. miRNA 在高危 HPV 感染的宫颈组织中表达的意义[J]. 热带医学杂志,2016,16(11):

1382-1385.  
 [5] 陶贝贝,周文娟,张婷. MicroRNA-10b 对宫颈癌细胞侵袭迁移能力的影响及机制研究[J]. 国际妇产科学杂志,2017,44(6):703-708.  
 [6] 李祎博,邓金桂,陈晶,等. 顺铂耐药人宫颈癌 HeLa 细胞株的建立及其相关耐药微小 RNA 的表达情况[J]. 广西医学,2017,39 (8):1198-1202.  
 [7] 张婷婷,彭慧霞. microRNA217 逆转人宫颈癌细胞顺铂耐药及其作用机制[J]. 陕西医学杂志,2017,46 (10):1348-1350.  
 [8] 张建洁,袁琳,陈雪,等. 宫颈癌组织 HeLa 细胞 RNF43 表达及其对宫颈癌细胞增殖能力的影响[J]. 疑难病杂志,2016,15(6):617-620.  
 [9] 赵醒,赵宇阳,王军,等. Caveolin-1 对宫颈癌细胞增殖和迁移能力的影响及其机制[J]. 中国妇幼保健,2016,31 (3):608-610.  
 [10] OLIVETO S, MANCINO M, MANFRINI N, et al. Role of microRNAs in translation regulation and cancer[J]. World J Biol Chem, 2017, 8 (1):45-56.  
 [11] TANG S, WANG D, ZHANG Q, et al. miR-218 suppresses gastric cancer cell proliferation and invasion via regulation of angiopoietin-2[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(6):3837-3842.  
 [12] LIU B, TIAN Y, FANG L, et al. Tumor-suppressing roles of miR-214 and miR-218 in breast cancer[J]. Oncol Rep, 2016, 35 (6):3178-3184.  
 [13] 王涛,马思聪,戚星星,等. MicroRNA-218 下调肝细胞癌中的 E2F2 基因表达抑制细胞增殖的研究[J]. 肝脏,2016,21 (3):179-182.  
 [14] JIANG Z, SONG Q, ZENG R, et al. MicroRNA-218 inhibits EMT, migration and invasion by targeting SFMBT1 and DCUN1D1 in cervical cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7 (29):45622-45636.  
 [15] 崔英. 宫颈癌组织 miR-218、Stat3 表达变化及其临床意义[J]. 山东医药,2017,57(36):79-81.  
 [16] 石玉荣,刘健,贺伟,等. MiR-218 在宫颈癌组织中的表达及对 HeLa 细胞凋亡及转移的影响[J]. 四川大学学报(医学版),2016,47 (5):697-702.

(收稿日期:2018-12-20 修回日期:2019-03-18)

(上接第 1797 页)

Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014, 6 (11):a022616.  
 [12] PRASHAR A, SCHNETTGER L, BERNARD E M, et al. Rab GTPases in immunity and inflammation[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 29(7):435.  
 [13] LANGEMEYER L, FROHLICH F, UNGERMANN C. Rab GTPase function in endosome and lysosome biogenesis[J]. Trends Cell Biol, 2018, 28(11):957-970.  
 [14] PFEFFER S R. Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways[J]. Mol Biol Cell, 2017, 28(6):712-715.

[15] BUCCI C, PARTON R G, MATHER I H, et al. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway[J]. Cell, 1992, 70(5):715-728.  
 [16] MOTT J, BARNEWALL R E, RIKIHISA Y. Human granulocytic ehrlichiosis agent and Ehrlichia chaffeensis reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells[J]. Infect Immun, 1999, 67(3):1368-1378.  
 [17] FRATTI R A, BACKER J M, GRUENBERG J, et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest[J]. J Cell Biol, 2001, 154(3):631-644.

(收稿日期:2019-01-20 修回日期:2019-04-15)