

引用本文:谭建福,饶丽娟,王秀.长链非编码RNA肝癌高表达转录本通过微小RNA-134-5p促进宫颈癌细胞恶性生物学行为的机制研究[J].安徽医药,2022,26(10):2044-2049.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.10.032.



◇临床医学◇

## 长链非编码RNA肝癌高表达转录本通过微小RNA-134-5p促进宫颈癌细胞恶性生物学行为的机制研究

谭建福<sup>1</sup>,饶丽娟<sup>1</sup>,王秀<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>长沙市中心医院妇科,湖南 长沙410007;

<sup>2</sup>宁乡市第四人民医院妇产科,湖南 长沙410611

通信作者:饶丽娟,女,副主任医师,研究方向妇科肿瘤、内分泌,Email:qtvnzn@163.com

**摘要:** 目的 探讨长链非编码RNA(lncRNA)肝癌高表达转录本(HULC)通过抑制微小RNA-134-5p促进宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移,促进凋亡的作用及其作用机制。方法 2019年10月至2020年5月,通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测体外培养的人正常宫颈上皮细胞和宫颈癌细胞中HULC的表达情况,在宫颈癌C-33A细胞中转染特异性HULC siRNA,qRT-PCR检测转染效果,细胞计数试剂盒(CCK-8)法分析C-33A细胞增殖情况,采用流式细胞术分析C-33A细胞凋亡情况,Transwell实验分析C-33A细胞侵袭和迁移能力,双荧光素酶报告基因实验检测HULC与miR-134-5p的相互作用。在抑制HULC表达的C-33A细胞中转染miR-134-5p抑制剂,以同样的方法检测对细胞增殖、侵袭和迁移的影响。结果 HULC在宫颈癌细胞(HeLa、Caski、SiHa、C-33A)中的表达水平为(1.95±0.24、2.26±0.21、1.77±0.19、3.49±0.40),显著高于正常宫颈上皮细胞1.00±0.11,HULC在C-33A细胞中的表达量最高( $P<0.05$ )。转染特异性HULC siRNA能够抑制C-33A细胞中HULC的表达(0.94±0.08比0.18±0.02)。抑制HULC表达后,C-33A细胞OD值降低(0.59±0.08比0.38±0.05),凋亡率明显升高[(3.01±0.34)%比(18.54±2.16)%],侵袭[112.54±13.86比46.28±10.16]和迁移(158.65±18.66比78.18±10.80)能力减弱。HULC能够与miR-134-5p特异性结合,负向调控miR-134-5p的表达。抑制miR-134-5p的表达能够逆转抑制HULC导致的C-33A细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移能力的抑制作用。结论 HULC通过抑制miR-134-5p的表达促进宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移,并诱导细胞凋亡。

**关键词:** 宫颈肿瘤; 长链非编码RNA肝癌高表达转录本; miR-134-5p; 增殖; 凋亡; 侵袭; 迁移

### LncRNA HULC promotes the malignant biological behavior of cervical cancer cells through miR-134-5p

TAN Jianfu<sup>1</sup>,RAO Lijuan<sup>1</sup>,WANG Xiu<sup>2</sup>

Author Affiliations:<sup>1</sup>Department of Gynecology, Changsha Central Hospital, Changsha, Hunan 410007,China;

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Ningxiang Fourth People's Hospital, Changsha, Hunan 410611, China

**Abstract:** **Objective** To explore the role and mechanism of long non-coding RNA (lncRNA) highly upregulated in liver cancer (HULC) by inhibiting miR-134-5p in promoting the proliferation, invasion and migration of cervical cancer cells and promoting apoptosis. **Methods** From October 2019 to May 2020, the expression of HULC in human normal cervical epithelial cells and cervical cancer cells cultured in vitro was detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). Specific HULC siRNA was transfected into cervical cancer C-33A cells, and the transfection effect was detected by qRT-PCR. CCK-8 method was adopted to analyze the proliferation of C-33A cells, flow cytometry to analyze the apoptosis of C-33A cells, and Transwell experiment to analyze the invasion and migration ability of C-33A cells. The dual luciferase reporter gene assay detected the interaction of HULC with miR-134-5p. The miR-134-5p inhibitors were transfected into C-33A cells that inhibited HULC expression, and the effects on cell proliferation, invasion and migration were examined in the same manner. **Results** The expressions of HULC in cervical cancer cells (HeLa, Caski, SiHa, C-33A) were 1.95±0.24, 2.26±0.21, 1.77±0.19, 3.49±0.40, respectively, which were significantly higher than that in normal cervical epithelial cells, (1.00±0.11). The expression of HULC was the highest in C-33A cells ( $P<0.05$ ). Transfection-specific HULC siRNA was able to inhibit HULC expression (0.94±0.08 vs. 0.18±0.02) in C-33A cells. After inhibiting the expression of HULC, the OD value of C-33A cells was decreased (0.59±0.08 vs. 0.38±0.05), the apoptotic rate was significantly increased [(3.01±0.34) % vs. (18.54±2.16) %], and the invasion (112.54±13.86 vs. 46.28±10.16) and migration (158.65±18.66 vs. 78.18±10.80) ability was weakened ( $P<0.05$ ). HULC was able to specifically bind to miR-134-5p and negatively regulate the expression of miR-134-5p. Inhibition of miR-134-5p expression reversed the inhibition of HULC-induced C-33A cell proliferation, apoptosis, invasion and migration. **Conclusion** HULC promotes the prolifer-

ation, invasion and migration of cervical cancer cells by inhibiting the expression of miR-134-5p, and induces apoptosis.

**Key words:** Uterine cervical neoplasms; lncRNA HULC; miR-134-5p; Proliferation; Apoptosis; Invasion; Migrate

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,在全世界女性癌症死亡原因占很大比例。据报道,全球每年有超过 520 000 名新增宫颈癌病人,每年因宫颈癌死亡人数超过 270 000<sup>[1]</sup>。由于巴氏涂片筛查试验的广泛实施,宫颈癌的发病率和死亡率在过去 30 年内有所下降,但晚期宫颈癌病人的预后仍较差,5 年生存率约为 15%<sup>[2]</sup>。因此,迫切需要深入了解宫颈癌发生和发展的分子机制,为确定新的诊断和预后标志物提供基础。长链非编码 RNA(long noncoding RNAs, lncRNAs)是一种不具有编码蛋白质能力的 RNA,长度>200 个核苷酸,可通过转录调控,转录后调控,在基因表达和细胞生物学功能中发挥作用<sup>[3-4]</sup>。大量研究表明 lncRNAs 与包括宫颈癌在内的多种癌症的发生和发展密切相关<sup>[5-6]</sup>。然而,目前关于宫颈癌发病和进展的 lncRNAs 较匮乏,以往报道显示, lncRNA 肝癌高表达转录本(highly upregulated in liver cancer, HULC)可促进胃癌、肝癌和骨肉瘤等肿瘤恶性进展,发挥致癌基因的功能<sup>[7-9]</sup>。近期研究发现, lncRNA HULC 在宫颈癌组织中表达量较高,但其是否参与宫颈癌细胞恶性生物学行为,目前未见相关报道<sup>[10]</sup>。目前研究发现, HULC 与下游微小 RNA(microRNAs, miRNA)存在作用靶点<sup>[11]</sup>,本研究前期通过生物信息学软件预测发现, HULC 与 miR-134-5p 间存在相似结合位点。miR-134-5p 可调控宫颈癌细胞增殖过程,具有一定抑癌作用。故本研究推测 HULC 可通过抑制 miR-134-5p 的表达参与宫颈癌的进展和预后。因此,本研究于 2019 年 10 月至 2020 年 5 月,探究 HULC 和 miR-134-5p 间的调控关系及对宫颈癌细胞生物学行为的影响,以期对宫颈癌的诊断提供潜在的标志物。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人正常宫颈上皮细胞 Ect1/E6E7 及宫颈癌细胞 HeLa、Caski、SiHa、C-33A 购自美国 ATCC; DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;特异性靶向 HULC siRNA 和非特异性 siRNA、miR-134-5p 模拟物(miR-134-5p mimics)、模拟物对照(mimics control)、miR-134-5p 抑制剂(miR-134-5p inhibitors)、抑制剂物对照(inhibitors control)均购自广州锐博; Trizol 试剂、M-MLV 逆转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; SYBR Green PCR 荧光检测试剂盒购自武汉塞维尔生物科技有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司。Transwell

小室购自美国 Corning 公司; Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自日本同仁化学研究所。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

**1.2 细胞培养及分组** 将宫颈癌 C-33A 细胞培养在含 10% 胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青-链霉素的 DMEM 培养基中,放置在体积分数为 5% 二氧化碳、37 °C 恒温培养箱中孵育,孵育 24 h 后更换培养基,稳定孵育 48 h,细胞贴壁生长汇合度达 80% 以上时,用胰蛋白酶消化传代,取对数增殖期的细胞进行后续转染实验。将生长状态良好的 C-33A 细胞接种到 96 孔板中,继续孵育 24 h,待细胞生长汇合约 50% 时,将特异性 HULC siRNA 和非特异性 siRNA 用 Lipofectamine 2000 转染至 C-33A 细胞中,分别命名为 si-HULC 组和 NC 组,以未转染的 C-33A 细胞命名为 Control 组,转染后的细胞放置在 37 °C 培养箱继续培养。特异性 HULC siRNA 序列:正向-5'-CCG-GAAUAUUCUUUGUUUAUU-3';反向-5'-UAAA-CAAAGAAUAUUCGGUU-3';非特异性 siRNA 序列:正向-5'-CCUUAUAUGUUCUGGAAUUUU-3';反向-5'-UAAAACGAAUGGAAUUCACUU-3'。

**1.3 qRT-PCR 检测细胞中 HULC 的表达** 采用 Trizol 法从正常宫颈上皮细胞 Ect1/E6E7 和宫颈癌细胞 HeLa、Caski、SiHa、C-33A 中提取 RNA, si-HULC 组和 NC 组 C-33A 细胞转染 48 h 后,同样以 Trizol 法提取细胞中 RNA。使用超微量核酸蛋白检测仪测定 RNA 的浓度和纯度,选取合格的 RNA 进行逆转录,合成 cDNA,通过 SYBR Green PCR 荧光检测试剂盒测定细胞中 HULC 相对表达水平,以 18S rRNA 作为内部对照,反应条件为:95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 采用 40 个循环。反应结束后分析溶解曲线,得出 Ct 值,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式计算细胞中 HULC 相对表达量,实验重复 3 次,取均值。引物:18S rRNA:正向引物 5'-AGGATCCATTGGAGGGCAAGT-3';反向引物 5'-TCCAACACTACGAGCTTTTAACTGCA-3'; HULC 正向引物 5'-TCATGATGGAATTGGAGCCTT-3';反向引物 5'-CTCTTCCTGGCTTGCAGATTG-3'。

**1.4 CCK-8 检测 C-33A 细胞的增殖能力** 将各组 C-33A 细胞用胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,以  $1 \times 10^3$  个/孔接种到 24 孔细胞培养板中,每组设置 3 个平行复孔,置 37 °C 培养箱继续培养 48 h,加入 20  $\mu$ L CCK-8, 37 °C 孵育 1 h,在酶标仪上吸光度值(OD

值),波长设为测定 450 nm。

**1.5 流式细胞术** 收集各组 C-33A 细胞,以 PBS 洗涤 2 次,加入适量 1×Binding Buffer 悬浮细胞并调整细胞至  $1 \times 10^6$  个/毫升,向细胞悬液中添加 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ L PI,避光反应 15 min,补加 1×Binding Buffer 缓冲液,1 h 内上流式细胞仪检测。

**1.6 Transwell 实验** 将 Transwell 小室置于 24 孔细胞培养板中,在小室的上室中加入 50  $\mu$ L 以不含血清培养基稀释的 Matrigel 基质胶,待基质胶凝固后备用。Transwell 小室的下室添加 600  $\mu$ L 含 15% 胎牛血清的培养基,收集各组细胞计数,取约  $1 \times 10^4$  个细胞加入到 Transwell 小室的上室(侵袭实验上室基底膜以 Matrigel 基质胶包被,迁移实验无需 Matrigel 包被),转移小室于 37  $^{\circ}$ C 培养箱 48 h 后取出,拭去上室细胞,用 0.1% 结晶紫染色 15 min,洗去染色,晾干后在显微镜下(随机选 5 个视野)观察并计数。

**1.7 双荧光素酶报告基因实验** 生物信息学软件 LncBase Experimental v.2 预测结果显示,HULC 与 miR-134-5p 存在相似结合位点,为进一步验证 HULC 能够靶向作用于 miR-134-5p,将 miR-134-5p 与 HULC 结合位点的 3' UTR 扩增并构建到荧光素酶报告基因载体上,记为 HULC-Wt,并将 miR-134-5p 与 HULC 乱序结合位点的 3' UTR 构建到荧光素酶报告基因载体上,记为 HULC-Mut。将 HULC-Wt 和 HULC-Mut 与 miR-134-5p mimics 或 mimics control 共同转染到 C-33A 细胞中,48 h 后使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒分析各组细胞的相对荧光素酶活性。

**1.8 转染 miR-135-5p inhibitor 逆转实验** 为进一步验证 HULC 靶向 miR-134-5p 调控宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移能力,本研究在抑制 HULC 表达的 C-33A 细胞中转染 miR-134-5p inhibitor 或 inhibitor 对照,分别记为 si-HULC+anti-NC 组和 si-HULC+anti-miR-134-5p 组,采用 qRT-PCR 技术检测 miR-134-5p 的表达水平,miR-134-5p 正向引物 5'-ATCTGTGACTGGTTGACCAGAGG-3';反向引物 5'-TG-CAGGGTCCGAGGT-3';U48 正向引物 5'-AGTGATGATGACCCAGGTAATC-3';反向引物 5'-CTGC-GGTGATGGCATCAG-3'。采用 CCK-8 检测、流式细胞术和 Transwell 实验分析细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移能力,步骤同上。

**1.9 统计学方法** 采用 SPSS 21.0 进行统计学分析,以上实验均重复 3 次,取均值,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组采用 *t* 检验分析相对荧光素酶活性,多组采用单因素方差分析 HULC 的表达量、细胞活力、凋亡率,以及侵袭和迁移细胞数,多组之间两两比较采用 LSD-*t* 检验的方法, $P < 0.05$  表示差异有统计学

意义。

## 2 结果

**2.1 HULC 在宫颈癌细胞中呈高表达** qRT-PCR 检测结果显示,与 Ect1/E6E7 细胞  $1.00 \pm 0.11$  相比,C-33A、Caski、SiHa、HeLa 细胞中 HULC 的表达量 ( $3.49 \pm 0.40$ 、 $2.26 \pm 0.21$ 、 $1.77 \pm 0.19$ 、 $1.95 \pm 0.24$ ) 明显升高 ( $F = 39.92$ ,  $P < 0.001$ ),在各宫颈癌细胞系中,C-33A 细胞中 HULC 的表达量最高 ( $P < 0.05$ ),因此选取 C-33A 细胞进行后续实验。

**2.2 抑制 HULC 的表达对 C-33A 细胞增殖和凋亡的影响** qRT-PCR 检测转染 HULC siRNA 48 h 后 C-33A 细胞中 HULC 的表达量,结果显示,与 Control 组和 NC 组比较,si-HULC 组细胞中 HULC 的表达量明显下调 ( $P < 0.05$ );Control 组和 NC 组间相比,HULC 的表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。CCK-8 实验检测细胞增殖能力,与 Control 组和 NC 组比较,si-HULC 组细胞活力显著降低 ( $P < 0.05$ );流式细胞术检测结果显示,与 Control 组和 NC 组比较,si-HULC 组细胞凋亡率明显升高 ( $P < 0.05$ );Control 组和 NC 组间相比,细胞 OD 值差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1,图 1。

表 1 各组 C-33A 细胞中 HULC 的表达量、细胞活力和凋亡率比较  $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	HULC	OD 值	凋亡率/%
Control	3	$1.01 \pm 0.10$	$0.64 \pm 0.11$	$2.88 \pm 0.30$
NC	3	$0.94 \pm 0.08$	$0.59 \pm 0.08$	$3.01 \pm 0.34$
si-HULC	3	$0.18 \pm 0.02^{①②}$	$0.38 \pm 0.05^{①②}$	$18.54 \pm 2.16^{①②}$
F 值		113.52	8.16	147.79
P 值		<0.001	0.019	<0.001

注:HULC 为肝癌高表达转录本,OD 为光密度。

①与 Control 组比, $P < 0.05$ 。②与 NC 组比, $P < 0.05$ 。

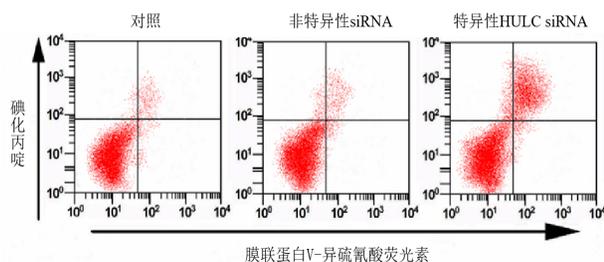


图 1 流式细胞术检测细胞凋亡

**2.3 抑制 HULC 的表达对 C-33A 细胞侵袭和迁移的影响** Transwell 实验结果显示,见图 2,表 2。si-HULC 组侵袭细胞数和迁移细胞数显著少于 Control 组和 NC 组 ( $P < 0.05$ )。

**2.4 HULC 抑制 miR-134-5p 的表达** 在线软件 LncBase Experimental v.2 预测结果显示,HULC 和 miR-134-5p 有靶向结合位点。双荧光素酶报告基

表2 Transwell实验检测细胞侵袭和迁移能力/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	侵袭细胞数	迁移细胞数
Control	3	120.15±16.24	176.33±20.04
NC	3	112.54±13.86	158.65±18.66
si-HULC	3	46.28±10.16 <sup>①②</sup>	78.18±10.80 <sup>①②</sup>
F值		26.58	28.43
P值		0.001	0.001

注: Control为对照, NC为非特异性siRNA, si-HULC为特异性HULC siRNA。

①与Control组比,  $P < 0.05$ 。②与NC组比,  $P < 0.05$ 。

因实验结果显示, 在HULC-Wt组中, 转染miR-134-5p mimics的细胞相对荧光度酶活性明显低于miR-NC组( $P < 0.05$ ); 在HULC-Mut组中, 两组细胞相对荧光度酶活性无明显改变( $P < 0.05$ )。为进一步验证HULC对miR-134-5p表达的负向调控作用, 本研究qRT-PCR检测抑制HULC的表达后对miR-134-5p表达的影响, 结果显示, 与NC组( $1.00 \pm 0.09$ )相比, si-HULC组细胞中miR-134-5p表达( $2.45 \pm 0.24$ )显著升高( $t = 16.37, P < 0.05$ )。见图3, 表3。

**2.5 抑制miR-134-5p的表达对C-33A细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响** qRT-PCR检测结果显示, 与si-HULC组和si-HULC+anti-NC组比, si-HULC+anti-miR-134-5p组细胞中miR-134-5p的表



图3 在线软件LncBase Experimental v.2预测HULC和miR-134-5p结合位点

表3 双荧光素酶报告基因实验检测HULC和miR-134-5p的相互作用/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	HULC-Wt	HULC-Mut
miR-NC	3	1.00±0.10	1.00±0.09
miR-134-5p	3	0.23±0.02	0.99±0.09
t值		22.65	0.24
P值		<0.001	0.817

注: miR-NC为模拟物对照, miR-134-5p为miR-134-5p模拟物, HULC-Wt为HULC野生型载体, HULC-Mut为HULC突变型载体。

表4 抑制miR-134-5p对C-33A细胞增殖、侵袭和迁移的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-134-5p	OD值	凋亡率	侵袭细胞数	迁移细胞数
si-HULC	3	1.00±0.10	0.39±0.05	18.14±2.25	48.02±10.04	80.20±9.24
si-HULC+anti-NC	3	0.99±0.11	0.41±0.04	19.22±2.43	47.96±8.64	82.36±10.58
si-HULC+anti-miR-134-5p	3	0.18±0.02 <sup>①②</sup>	0.61±0.06 <sup>①②</sup>	8.27±1.14 <sup>①②</sup>	96.28±12.12 <sup>①②</sup>	156.82±16.15 <sup>①②</sup>
F值		88.57	17.30	26.72	21.70	37.39
P值		<0.001	0.003	0.001	0.002	<0.001

注: si-HULC为特异性HULC siRNA, si-HULC+anti-NC为特异性HULC siRNA+抑制剂对照, si-HULC+anti-miR-134-5p为特异性HULC siRNA+miR-134-5p抑制剂, OD为光密度。

①与si-HULC组比,  $P < 0.05$ 。②与si-HULC+anti-NC组比,  $P < 0.05$ 。

达水平明显降低( $P < 0.05$ )。CCK-8实验结果显示, 与si-HULC组和si-HULC+anti-NC组比, si-HULC+anti-miR-134-5p组细胞OD值显著升高( $P < 0.05$ )。流式细胞术检测结果显示, 与si-HULC组和si-HULC+anti-NC组比, si-HULC+anti-miR-134-5p组细胞凋亡率明显降低( $P < 0.05$ )。Transwell实验结果显示, 与si-HULC组和si-HULC+anti-NC组比, si-HULC+anti-miR-134-5p组侵袭细胞数和迁移细胞数均明显增多( $P < 0.05$ )。si-HULC组和si-HULC+anti-NC组相比, 以上各指标均差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图4, 5; 表4。

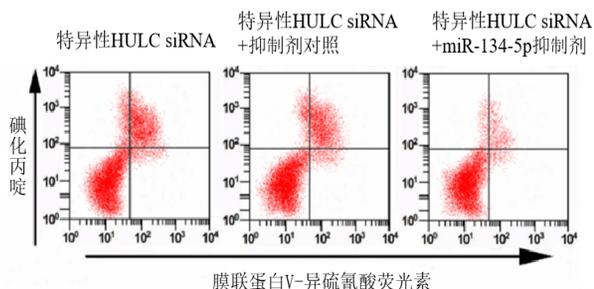


图4 抑制miR-134-5p的表达对C-33A细胞凋亡的影响

### 3 讨论

宫颈癌是全球常见的妇科恶性肿瘤之一, 也是全世界女性癌症死亡的主要原因<sup>[12]</sup>。探索宫颈癌发生的分子机制有利于开发宫颈癌的新疗法。本研究首次探讨了lncRNA HULC和miR-134-5p在宫颈癌中的表达模式和生物学功能。越来越多的证据表明, lncRNA可以在转录水平或转录后水平调节靶基因, 参与机体多种生长发育和病理过程<sup>[13-14]</sup>。多项研究表明, lncRNA可作为致癌基因或抑癌基因参与肿瘤发生、浸润、转移、预后和诊断<sup>[15-16]</sup>。在先前的研究中, 发现HULC表达上调参与调控肝癌、胃癌、前列腺癌等肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移<sup>[17-19]</sup>。以往研究结果表明, HULC可能在肿瘤细胞生物学行为中发挥重要功能。近期发现HULC在宫颈癌中表达亦呈高表达, 且与病人预后不良密切相关<sup>[10]</sup>。但关于HULC与宫颈癌细胞生物学功能的研

究鲜有报道,因此,本研究旨在探究HULC对宫颈癌细胞生物学行为的影响及分子机制。本研究结果发现,HULC在宫颈癌细胞中的表达显著高于人正常宫颈上皮细胞Ect1/E6E7。qRT-PCR检测结果显示,在宫颈癌C-33A细胞中转染HULC siRNA后HULC的表达显著下调,提示转染HULC siRNA可有效抑制HULC的表达。此外本研究发现,抑制HULC的表达后C-33A细胞OD值降低,凋亡率升高,侵袭和迁移细胞数减少,表明抑制HULC的表达可抑制宫颈癌C-33A细胞增殖、侵袭和迁移能力,诱导细胞凋亡。因此,推测HULC对宫颈癌的发生和发展具有重要作用。

lncRNA在人类疾病中的重要性可能与它们通过各种机制影响细胞功能的能力有关<sup>[20-21]</sup>。受到“竞争性内源RNA”调控网络的启发,假设HULC也可作为ceRNA,因此需寻找与HULC相互作用的潜在的miRNA。为支持这一观点,本研究采用生物信息学分析软件预测与HULC相互作用的miRNA,发现miR-134-5p与HULC可形成互补碱基配对。此外通过双荧光素酶报告基因验证了HULC与miR-134-5p相互作用。qRT-PCR检测结果进一步验证了HULC可负向调控miR-134-5p的表达。有研究发现,miR-134-5p可通过靶向整合素 $\beta$ 1抑制非小细胞肺癌A549和H1299细胞的侵袭和迁移<sup>[22]</sup>。汤继英等<sup>[23]</sup>研究发现,miR-134-5p的过表达不仅可以抑制人宫颈癌细胞体外增殖和细胞周期进程,还可以诱导细胞凋亡。结合本研究结果提示,抑制HULC的表达抑制宫颈癌C-33A细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移与上调miR-134-5p的表达有关。为进一步验证该结论,本研究在抑制HULC表达的C-33A细胞中转染miR-134-5p抑制物,检测发现,抑制miR-134-5p的表达后可逆转HULC表达下调导致的C-33A细胞增殖、侵袭和迁移的抑制作用,逆转HULC表达下调诱导的细胞凋亡,表明HULC靶向调控miR-134-5p参与宫颈癌细胞生物学行为的调控。

综上所述,本研究证明HULC在宫颈癌组织和细胞中表达上调,体外抑制宫颈癌C-33A细胞中HULC的表达可抑制细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移能力,其作用机制可能与上调miR-134-5p的表达有关。关于miR-134-5p调控下游靶基因的研究本实验暂未涉及,后续研究将进一步探究。随着HULC的深入研究,其可能成为宫颈癌的潜在预后生物标志物和治疗靶点。

(本文图2,5见插图10-4)

## 参考文献

- [1] NANTHAMONGKOLKUL K, HANPRASERTPONG J. Longer waiting times for early stage cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy are associated with diminished long-term overall survival[J]. *J Gynecol Oncol*, 2015, 26(4):262-269.
- [2] BEAVIS AL, GRAVITT PE, MSPH AFR. Hysterectomy-corrected cervical cancer mortality rates reveal a larger racial disparity in the United States[J]. *Cancer*, 2017, 123(6):1044-1050.
- [3] LIZ J, ESTELLER M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859(1):169-176.
- [4] EVANS JR, FENG FY, CHINNAIYAN AM. The bright side of dark matter: lncRNAs in cancer[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8):2775-2782.
- [5] PENG L, YUAN X, JIANG B, et al. lncRNAs: key players and novel insights into cervical cancer[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(3):2779-2788.
- [6] CHI S, SHEN L, HUA T, et al. Prognostic and diagnostic significance of lncRNAs expression in cervical cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(45):79061-79072.
- [7] JIN C, SHI W, WANG F, et al. Long non-coding RNA HULC as a novel serum biomarker for diagnosis and prognosis prediction of gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32):51763-51772.
- [8] LU Z, XIAO Z, LIU F, et al. Long non-coding RNA HULC promotes tumor angiogenesis in liver cancer by up-regulating sphingosine kinase 1 (SPHK1)[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(1):241-254.
- [9] UZAN VR M, LENGERT AV H, BOLDRINI É, et al. High expression of HULC is associated with poor prognosis in osteosarcoma patients [J/OL]. *Plos One*, 2016, 11(6):e0156774. DOI: 10.1371/journal.pone.0156774.
- [10] WANG YF, ZHANG S, LI XQ, et al. Expression of lncRNA HULC in cervical cancer and its correlation with tumor progression and patient survival[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(19):3987-3991.
- [11] KONG D, WANG Y. Knockdown of lncRNA HULC inhibits proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis by sponging miR-122 in osteosarcoma[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1):1050-1061.
- [12] JR SW, BACON MA, BAJAJ A, et al. Cervical cancer: a global health crisis[J]. *Cancer*, 2017, 123(13):2404-2412.
- [13] ENGREITZ JM, HAINES JE, PEREZ EM, et al. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing[J]. *Nature*, 2016, 539(7629):452-455.
- [14] YANG G, LU X, YUAN L. lncRNA: a link between RNA and cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1839(11):1097-1109.
- [15] DHAMIJA S, DIEDERICH S. From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, EMT and metastasis [J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(2):269-280.
- [16] ZHOU M, WANG X, SHI H, et al. Characterization of long non-coding RNA-associated ceRNA network to reveal potential prognostic lncRNA biomarkers in human ovarian cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(11):12598-12611.
- [17] WANG Y, CHEN F, ZHAO M, et al. The long noncoding RNA HULC promotes liver cancer by increasing the expression of the

- HMGA2 oncogene via sequestration of the microRNA-186 [J]. J Biol Chem, 2017, 292(37):15395-15407.
- [18] ZHANG Y, SONG X, WANG X, et al. Silencing of lncRNA HULC enhances chemotherapy induced apoptosis in human gastric cancer [J]. J Med Biochem, 2016, 35(2):137-143.
- [19] CHEN C, WANG K, WANG Q, et al. lncRNA HULC mediates radioresistance via autophagy in prostate cancer cells [J/OL]. Braz J Med Biol Res, 2018, 51(6): e7080. DOI: 10.1590/1414-431x20187080.
- [20] GONZALEZ I, MUNITA R, AGIRRE E, et al. A lncRNA regulates alternative splicing via establishment of a splicing-specific chromatin signature [J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22(5): 370-376.
- [21] CHAO S, JIAN Z, YAN L, et al. Construction and analysis of cardiac hypertrophy-associated lncRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA reveal functional lncRNAs in cardiac hypertrophy [J]. Oncotarget, 2016, 7(10):10827-10840.
- [22] QIN Q, WEI F, ZHANG J, et al. miR-134 inhibits non-small cell lung cancer growth by targeting the epidermal growth factor receptor [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(10):1974-1983.
- [23] 汤继英, 蔡晓军, 汪选斌, 等. miR-134-5p 对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响及其分子机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(7):742-747.

(收稿日期:2020-10-13,修回日期:2021-01-05)

引用本文:曾雅婕,蒋柳宏,赵波,等.血清膜联蛋白 A2 与口腔鳞癌病人放化疗敏感性及其预后的关系[J].安徽医药, 2022, 26(10):2049-2052. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.10.033.



◇临床医学◇

## 血清膜联蛋白 A2 与口腔鳞癌病人放化疗敏感性及其预后的关系

曾雅婕, 蒋柳宏, 赵波, 李轶

作者单位:广州中医药大学第一附属医院口腔科, 广东 广州 510000

**摘要:** 目的 分析血清膜联蛋白 A2 (ANXA2) 在中晚期口腔鳞癌 (OSCC) 病人中的表达, 并探讨其与放化疗敏感性及其预后的关系。方法 将 2013 年 2 月至 2015 年 2 月广州中医药大学第一附属医院收治的 68 例中晚期 OSCC 病人纳入为研究组, 另将 68 例同期体检健康者为对照组, OSCC 病人行放化疗治疗, 收集受试者血清, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清 ANXA2 水平, 比较两组血清 ANXA2 水平, 与病理参数、放化疗敏感性及其预后的关系。结果 研究组病人血清 ANXA2 水平 ( $28.15 \pm 6.24$ )  $\mu\text{g/L}$  明显高于对照组 ( $13.92 \pm 4.18$ )  $\mu\text{g/L}$  ( $P < 0.05$ ); 血清 ANXA2 表达与 OSCC 病人年龄、性别、肿瘤大小无关 ( $P > 0.05$ ), 与 TNM 分期、分化程度、淋巴结转移、远处转移相关 ( $P < 0.05$ ); ANXA2 高表达组病人放化疗总有效率为 54.84%, 明显低于 ANXA2 低表达组病人总有效率的 78.38% ( $P < 0.05$ ); OSCC 病人血清 ANXA2 低表达病人 5 年中位数生存时间为 ( $37.00 \pm 5.28$ ) 个月, 高表达组 5 年中位数生存时间为 ( $28.00 \pm 3.89$ ) 个月, 两组病人预后 5 年中位数生存时间比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 OSCC 病人血清 ANXA2 高表达, 并与 TNM 分期、分化程度、淋巴结转移、远处转移相关, ANXA2 高表达者的放化疗敏感性低, 预后差。**关键词:** 口腔肿瘤; 癌, 鳞状细胞; 膜联蛋白 A2; 临床病理参数; 放化疗敏感性; 预后

### Relationships between serum annexin A2 and chemosensitivity and prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma

ZENG Yajie, JIANG Liuhong, ZHAO Bo, LI Yi

Author Affiliation: Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510000, China

**Abstract:** **Objective** To analyze the expression of serum annexin A2 (ANXA2) in patients with advanced oral squamous cell carcinoma (OSCC), and to explore its relationship with chemosensitivity and prognosis. **Methods** Sixty-eight patients with advanced OSCC admitted to The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine from February 2013 to February 2015 were included as the study group, and 68 healthy people in the same period were selected as the control group. OSCC patients were treated with radiotherapy and chemotherapy, serum of whom was collected, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum ANXA2 level. The relationships between serum ANXA2 level with pathological parameters, chemoradiotherapy sensitivity, and prognosis were compared between the two groups. **Results** The serum ANXA2 level of the study group was significantly higher than that of the control group [ $(28.15 \pm 6.24) \mu\text{g/L}$  vs.  $(13.92 \pm 4.18) \mu\text{g/L}$ ;  $P < 0.05$ ]. The serum expression of ANXA2 was not correlated with age, gender, and tumor size of OSCC patients ( $P > 0.05$ ), but correlated with TNM staging, differentiation degree, lymph node metastasis, and distant metastasis ( $P < 0.05$ ). The total effective rate of chemoradiation in patients with high ANXA2 expression