

· 论 著 ·

FLVCR1-AS1 靶向 miR-877-5p 对宫颈癌细胞 SiHa 增殖、迁移和侵袭的影响

王朝英, 徐军女, 罗靖茹, 林海锋

海南医学院第二附属医院肿瘤内科, 海南 海口 570311

摘要: **目的** 探讨猫白血病病毒 C 亚类受体 1 反义 RNA1 (FLVCR1-AS1) 对宫颈癌细胞 SiHa 增殖、迁移和侵袭的影响及可能机制。**方法** 收集 2016 年 12 月至 2018 年 11 月在海南医学院第二附属医院行手术治疗的 35 例宫颈癌患者的癌组织和癌旁组织。体外培养 SiHa 细胞, 按不同转染分为 si-NC 组、小干扰 RNA (si)-FLVCR1-AS1 组、miR-NC 组、微小 RNA (miR)-877-5p 组、si-FLVCR1-AS1+anti-miR-NC 组、si-FLVCR1-AS1+anti-miR-877-5p 组, CCK-8 法检测细胞增殖, Transwell 检测细胞迁移和侵袭, Western Blot 法检测细胞中 Ki-67、基质金属蛋白酶 (MMP)-2 和 MMP-9 蛋白表达, RT-qPCR 检测 FLVCR1-AS1 和 miR-877-5p 表达。双荧光素酶报告基因实验验证 FLVCR1-AS1 和 miR-877-5p 的调控关系。**结果** 宫颈癌组织中 FLVCR1-AS1 表达量高于癌旁组织 (3.82 ± 0.23 vs 1.00 ± 0.08 , $t = 68.510$, $P < 0.01$); 而 miR-877-5p 表达量低于癌旁组织 (0.32 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.05 , $t = 68.993$, $P < 0.01$)。经转染后, si-FLVCR1-AS1 组 SiHa 细胞中 FLVCR1-AS1 表达较 si-NC 组显著下调 ($P < 0.01$), 且其 OD 值、迁移数、侵袭数及 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达量均低于 si-NC 组 ($P < 0.01$)。miR-877-5p 组 SiHa 细胞中 miR-877-5p 表达较 miR-NC 组显著上调 ($P < 0.01$), 且其 OD 值、迁移数、侵袭数及 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达量均低于 miR-NC 组 ($P < 0.01$)。与 miR-877-5p 抑制剂共转染后, si-FLVCR1-AS1+anti-miR-877-5p 组 SiHa 细胞 OD 值、迁移数、侵袭数及 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达量均高于 si-FLVCR1-AS1+anti-miR-NC 组 ($P < 0.01$)。**结论** FLVCR1-AS1 可能通过靶向抑制 miR-877-5p 的表达促进宫颈癌细胞 SiHa 增殖、迁移和侵袭。

关键词: 宫颈癌; 猫白血病病毒 C 亚类受体 1 反义 RNA1; 微小 RNA-877-5p; 迁移; 侵袭

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2021)12-1605-05

Effect of FLVCR1-AS1 on SiHa cervical cancer cells proliferation, migration and invasion via targeting miR-877-5p

WANG Chao-ying, XU Jun-nyu, LUO Jing-ru, LIN Hai-feng

Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570311, China

Corresponding author: LIN Hai-feng, E-mail: 13322060949@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of feline leukemia virus subgroup C receptor 1-antisense 1 (FLVCR1-AS1) on the proliferation, migration and invasion of SiHa cervical cancer cells and its possible mechanism. **Methods** The cancer tissues and adjacent tissues were collected from 35 patients with cervical cancer who underwent surgery in the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College from December 2016 to November 2018. SiHa cells were cultured in vitro and transfected respectively with negative control siRNA (si-NC group), si-FLVCR1-AS1 (si-FLVCR1-AS1 group), miR-NC (miR-NC group), miR-877-5p mimics (miR-877-5p group) and co-transfected with si-FLVCR1-AS1 and anti-miR-NC (si-FLVCR1-AS1+anti-miR-NC group) and with si-FLVCR1-AS1 and anti-miR-877-5p (si-FLVCR1-AS1+anti-miR-877-5p group). CCK-8 method was used to detect the cell proliferation, and transwell method was used to detect the migration and invasion of cells. The protein expressions of Ki-67, MMP-2 and MMP-9 were determined by western blot method and the expressions of FLVCR1-AS1 and miR-877-5p were detected by RT-qPCR. The regulatory

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2021.12.002

基金项目: 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2017087)

通信作者: 林海锋, E-mail: 13322060949@163.com

relationship between FLVCR1-AS1 and miR-877-5p was confirmed by double-luciferase reporter gene assay. **Results** The expression level of FLVCR1-AS1 in cervical cancer tissue was significantly higher than that in adjacent tissue (3.82 ± 0.23 vs 1.00 ± 0.08 , $t = 68.510$, $P < 0.01$), and the expression level of miR-877-5p was lower than that in adjacent tissue (0.32 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.05 , $t = 68.993$, $P < 0.01$). After transfection, the expression of FLVCR1-AS1 in SiHa cells was significantly down-regulated in si-FLVCR1-AS1 group compared to si-NC group ($P < 0.01$), the expression of miR-877-5p in SiHa cells was significantly up-regulated in miR-877-5p group compared to miR-NC group ($P < 0.01$), and their OD value, migration and invasion of SiHa cells and the protein expressions of Ki-67, MMP-2 and MMP-9 in si-FLVCR1-AS1 group and in miR-877-5p group were significantly lower than those in si-NC group and in miR-NC group, respectively ($P < 0.05$). After co-transfection with miR-877-5p inhibitor, the OD value, migration number, invasion number and protein expression of Ki-67, MMP-2 and MMP-9 of SiHa cells in si-FLVCR1-AS1+anti-miR-877-5p group were higher than those in si-FLVCR1-AS1+anti-miR-NC group. **Conclusion** FLVCR1-AS1 may promote the proliferation, migration and invasion of SiHa cervical cancer cells by targeted inhibition of miR-877-5p expression.

Keywords: Cervical cancer; Feline leukemia virus subgroup C receptor 1-antisense 1, FLVCR1-AS1; miR-877-5p; Migration; Invasion

Fund program: Hainan Key Research and Development Plan Project (ZDYF2017087)

宫颈癌发病率逐年升高,且其发病呈年轻化趋势^[1],严重影响女性生命健康。宫颈癌的发生发展是一个复杂的过程,受多种基因分子的调控^[2]。猫白血病病毒 C 亚类受体 1 反义 RNA1(feline leukemia virus subgroup C receptor 1 antisense RNA 1, FLVCR1-AS1)属于长链非编码 RNA(lncRNA)家族,其在非小细胞肺癌^[3]、肝癌^[4]和卵巢癌^[5]等肿瘤中表达上调,对这些肿瘤的发生发展具有明显促进作用。然而,FLVCR1-AS1 能否影响宫颈癌的发展进程还未知。StarBase 生物信息学软件预测显示,FLVCR1-AS1 可能靶向结合微小核糖核酸(miR)-877-5p。有报道称,喉癌^[6]和胃癌^[7]等肿瘤中 miR-877-5p 的表达下调,上调 miR-877-5p 则抑制肿瘤的发展进程。本研究首先检测了 35 例宫颈癌患者的癌组织和癌旁组织中 FLVCR1-AS1 和 miR-877-5p 的表达,然后以宫颈癌细胞 SiHa 为研究对象,观察了下调 FLVCR1-AS1 能否靶向调控 miR-877-5p 影响 SiHa 细胞的增殖、迁移和侵袭,以期了解 FLVCR1-AS1/miR-877-5p 轴对宫颈癌发生发展的影响,为宫颈癌的治疗提供新靶点。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 35 例于 2016 年 12 月至 2018 年 11 月在海南医学院第二附属医院行手术治疗的宫颈癌患者的癌组织和癌旁组织,液氮保存。患者年龄(53.26 ± 7.49)岁。35 例宫颈癌患者中宫颈鳞癌 29 例、腺癌 6 例;高分化 6 例、中分化 12 例,低分化 17 例;临床 TNM 分期 I 期 8 例、II 期 13 例、III 期 14 例;淋巴结转移 21 例,未转移 14 例。所有病例经

病理诊断确诊,且患者术前未接受放疗、化疗等治疗。研究符合赫尔辛基宣言原则。患者对本研究知情同意。

1.2 细胞和试剂 SiHa 细胞系,中国科学院上海细胞库;胎牛血清,浙江天杭;RPMI 1640 培养基、CCK-8 试剂盒和 BCA 蛋白检测试剂盒,北京索莱宝;引物序列、FLVCR1-AS1 小干扰 RNA(si-FLVCR1-AS1)及阴性对照序列(si-NC)、FLVCR1-AS1 野生型荧光素酶报告载体(WT-FLVCR1-AS1)和荧光素酶报告载体(MUT-FLVCR1-AS1)、miR-877-5p 模拟物(mimics)和抑制剂(anti-miR-877-5p)、模拟对照序列(miR-NC)及抑制剂阴性对照序列(anti-miR-NC),上海吉玛制药技术;逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒,大连宝生物;兔抗人 Ki-67、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 和 GAPDH 抗体,美国 Santa Cruz 公司;Lipofectamine™ 2000 试剂盒和 Trizol 试剂,美国 Invitrogen 公司。

1.3 方法

1.3.1 RT-qPCR 检测 FLVCR1-AS1 和 miR-877-5p 表达 Trizol 试剂提取组织中总 RNA,逆转录为 cDNA,行 PCR 扩增。引物:FLVCR1-AS1 上游 5'-AGAATTGGAGGCGAGTCACA-3',下游 5'-TTCTGTTTCGGTGCTCTCT-3'; GAPDH 上游 5'-TATGATGATATCAAGAGGGTAGT-3',下游 5'-TGTATCCAACTCATTGTCATAC-3'; miR-877-5p 上游 5'-TAGAGGAGATGGCGAG-3',下游 5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3'。2^{-ΔΔCt}法计算 FLVCR1-AS1、miR-877-5p 相对 GAPDH 的表达量。

1.3.2 细胞培养和转染 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(完全培养基)培养 SiHa 细胞。取

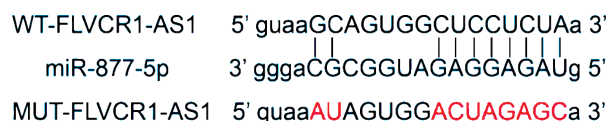
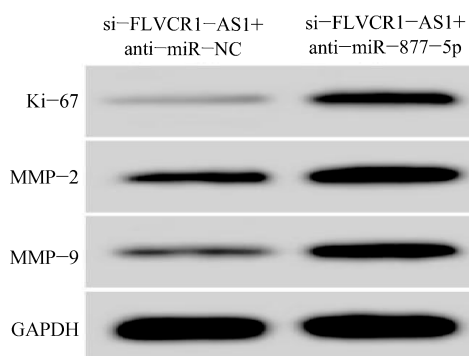
表 3 下调 miR-877-5p 对已下调 FLVCR1-AS1 宫颈癌 SiHa 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

分组	miR-877-5p	OD 值	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	Ki-67	MMP-2	MMP-9
si-FLVCR1-AS1+anti-miR-NC	1.00±0.05	0.34±0.03	54.62±3.88	40.27±3.05	0.14±0.02	0.35±0.03	0.26±0.02
si-FLVCR1-AS1+anti-miR-877-5p	0.33±0.03	0.57±0.04	93.64±6.04	70.84±5.07	0.45±0.04	0.71±0.06	0.57±0.04
<i>t</i> 值	34.471	13.800	16.306	15.502	20.795	16.100	20.795
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 FLVCR1-AS1 靶向对 miR-877-5p 表达的调控

如图 3 所示,FLVCR1-AS1 与 miR-877-5p 的核苷酸序列存在连续结合位点。共转染 WT-FLVCR1-AS1 与 miR-877-5p mimics 的细胞荧光素酶活性为 0.58 ± 0.04 , 显著低于共转染 WT-FLVCR1-AS1 与 miR-NC 的细胞荧光素酶活性 1.05 ± 0.07 ($t = 17.489, P < 0.01$); 共转染 MUT-FLVCR1-AS1 与 miR-877-5p mimics、MUT-FLVCR1-AS1 与 miR-NC 的细胞荧光素酶活性分别为 1.03 ± 0.05 、 1.01 ± 0.08 , 两者比较差异无统计学意义 ($t = 0.636, P = 0.534$)。si-FLVCR1-AS1 组 SiHa 细胞中 miR-877-5p 的表达量为 2.85 ± 0.23 , 显著高于 si-NC 组 miR-877-5p 的表达量 ($1.03 \pm 0.06, t = 22.970, P < 0.01$)。

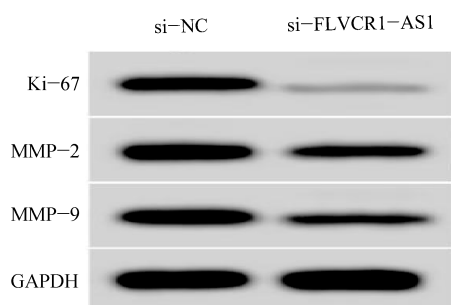
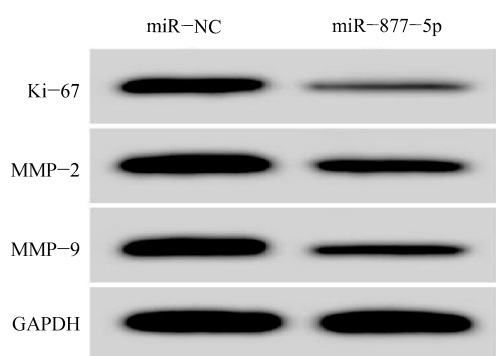
2.5 抑制 miR-877-5p 对已下调 FLVCR1-AS1 的宫颈癌 SiHa 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 si-FLVCR1-AS1+anti-miR-NC 组 SiHa 细胞中 miR-877-5p 表达量显著低于 miR-NC 组 ($P < 0.01$)。si-FLVCR1-AS1+anti-miR-NC 组 SiHa 细胞 OD 值、迁移数和侵袭数以及 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 表达量均高于 si-FLVCR1-AS1+anti-miR-NC 组 ($P < 0.01$)。见表 3、图 4。

**图 3** FLVCR1-AS1 的序列中含有与 miR-877-5p 互补的核苷酸序列**图 4** 抑制 miR-877-5p 后对已下调 FLVCR1-AS1 的 SiHa 细胞中 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响

3 讨论

原癌基因的激活及抑癌基因的失活对肿瘤的发生发展起重要作用。lncRNA 是一类非编码 RNA, 在真核生物中广泛存在。随着对 lncRNA 研究的深入, 发现肿瘤中存在大量异常表达的 lncRNA, 这些 lncRNA 可发挥 miRNA 分子海绵作用, 调控 miRNA 靶基因的表达, 进而参与调控肿瘤细胞恶性表型, 对肿瘤发病机制的阐明及治疗靶点的选择提供了新途径。研究已表明, PCAT-1^[8]、DANCR^[9]、HCP5^[10] 等 lncRNA 在宫颈癌中表达升高, 促进宫颈癌的发展进程; 而 MEG3^[11]、GAS5^[12] 等 lncRNA 在宫颈癌中表达降低, 发挥抑癌基因作用抑制宫颈癌的发生发展。

作为一种 lncRNA, FLVCR1-AS1 参与多种肿瘤的发展进程。有报道称, 神经胶质瘤组织和细胞系中 FLVCR1-AS1 呈高表达, 下调 FLVCR1-AS1 表达可靶向调控 miR-4731-5p/E2F2 轴阻碍神经胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭, FLVCR1-AS1 作为促癌基因促进神经胶质瘤的发展^[13]; FLVCR1-AS1 在胆管癌组织和细胞系中呈高表达, 敲减 FLVCR1-AS1 对体外胆管癌细胞增殖、集落形成、迁移和侵袭及体内肿瘤生长具有明显抑制作用^[14]; FLVCR1-AS1 高表达的胃癌患者预后较差, 上调 FLVCR1-AS1 促进胃癌细胞增殖和侵袭,

**图 1** 下调 FLVCR1-AS1 表达后 SiHa 细胞中 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达**图 2** 上调 miR-877-5p 表达后 SiHa 细胞中 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达

FLVCR1-AS1 可作为胃癌治疗的分子靶点^[15]; FLVCR1-AS1 在肺癌组织和细胞系中表达增加, 敲低 FLVCR1-AS1 可通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路降低肺癌细胞的恶性生物学行为^[16]。本研究显示, 宫颈癌组织中 FLVCR1-AS1 的表达显著高于癌旁组织, 提示 FLVCR1-AS1 可能促进宫颈癌的发展进程; 下调 FLVCR1-AS1 表达降低了宫颈癌 SiHa 细胞增殖、迁移和侵袭能力及细胞中增殖、迁移和侵袭相关蛋白 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 的表达, 提示 FLVCR1-AS1 作为促癌基因参与宫颈癌的发展进程, 其也可能成为宫颈癌治疗的分子靶点。

本研究证实 FLVCR1-AS1 靶向负调控 SiHa 细胞 miR-877-5p 的表达, 这与本研究患者宫颈癌组织中 FLVCR1-AS1 表达升高而 miR-877-5p 表达降低的结果一致。有研究显示, lncRNA TRG-AS1 在胶质母细胞瘤组织和细胞中表达上调, 其可靶向抑制 miR-877-5p 并上调其靶基因 SUZ12 的表达促进胶质母细胞瘤细胞增殖^[17]; miR-877-5p 在肝癌组织或细胞系中表达下调, 其低表达与组织学分级、TNM 分期及预后密切相关, 上调 miR-877-5p 表达可通过靶向下调 CDK14 的表达阻碍肝癌细胞增殖、迁移和侵袭^[18]。本研究显示, 上调 miR-877-5p 对 SiHa 细胞增殖、迁移和侵袭及相关蛋白 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 具有明显的抑制作用, 提示 miR-877-5p 也可作为宫颈癌治疗的分子靶点。本研究还显示, 同时下调 miR-877-5p 和 FLVCR1-AS1 的 SiHa 细胞增殖、迁移和侵袭能力明显强于仅下调 FLVCR1-AS1 的 SiHa 细胞, 提示 FLVCR1-AS1 可能通过靶向抑制 miR-877-5p 来促进宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭, 但其具体调控机制还有待进一步探究。

综上所述, 宫颈癌组织中 FLVCR1-AS1 呈高表达, 而 miR-877-5p 呈低表达; 下调 FLVCR1-AS1 表达对宫颈癌细胞 SiHa 增殖、迁移和侵袭具有明显的抑制作用, 其作用机制可能与靶向负调控 miR-877-5p 有关, FLVCR1-AS1/miR-877-5p 轴可能为宫颈癌的治疗提供新靶点。本课题组接下来将进一步探究 miR-877-5p 下游靶基因和信号通路在宫颈癌发生发展中的作用及通过动物实验验证 FLVCR1-AS1/miR-877-5p 轴对宫颈癌发展的影响。

参考文献

- [1] 张蓉, 宋淑芳. 绝经后子宫颈癌前病变的筛查及诊治进展[J]. 中国妇产科临床杂志, 2020, 21(1): 104-106.
- [2] 李密, 刘匀慧, 姚远. miR-141 和 lncRNA-H19 在宫颈癌中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(13): 2333-2336.
- [3] Gao XY, Zhao SS, Yang XH, et al. Long non-coding RNA FLVCR1-AS1 contributes to the proliferation and invasion of lung cancer by sponging miR-573 to upregulate the expression of E2F transcription factor 3[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 505(3): 931-938.
- [4] Zhang K, Zhao Z, Yu J, et al. LncRNA FLVCR1-AS1 acts as miR-513c sponge to modulate cancer cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(7): 6045-6056.
- [5] Yan H, Li H, Silva MA, et al. LncRNA FLVCR1-AS1 mediates miR-513/YAP1 signaling to promote cell progression, migration, invasion and EMT process in ovarian cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 356.
- [6] Wang X, Liu L, Zhao W, et al. LncRNA SNHG16 promotes the progression of laryngeal squamous cell carcinoma by mediating miR-877-5p/FOXP4 axis[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 4569-4579.
- [7] Wu K, Yu Z, Tang Z, et al. miR-877-5p suppresses gastric cancer cell proliferation through targeting FOXM1[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 4731-4742.
- [8] Ma TT, Zhou LQ, Xia JH, et al. LncRNA PCAT-1 regulates the proliferation, metastasis and invasion of cervical cancer cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(7): 1907-1913.
- [9] Liang H, Zhang C, Guan H, et al. LncRNA DANCER promotes cervical cancer progression by upregulating ROCK1 via sponging miR-335-5p[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 7266-7278.
- [10] Yu Y, Shen HM, Fang DM, et al. LncRNA HCP5 promotes the development of cervical cancer by regulating MACC1 via suppression of microRNA-15a[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(15): 4812-4819.
- [11] Zhu J, Han S. Lidocaine inhibits cervical cancer cell proliferation and induces cell apoptosis by modulating the lncRNA-MEG3/miR-421/BTG1 pathway[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(9): 5404-5416.
- [12] Yang W, Xu X, Hong L, et al. Upregulation of lncRNA GAS5 inhibits the growth and metastasis of cervical cancer cells[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 23571-23580.
- [13] Yan Z, Zhang W, Xiong Y, et al. Long noncoding RNA FLVCR1-AS1 aggravates biological behaviors of glioma cells via targeting miR-4731-5p/E2F2 axis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 521(3): 716-720.
- [14] Bao W, Cao F, Ni S, et al. LncRNA FLVCR1-AS1 regulates cell proliferation, migration and invasion by sponging miR-485-5p in human cholangiocarcinoma[J]. Oncol Lett, 2019, 18(3): 2240-2247.
- [15] Liu Y, Guo GZ, Zhong ZJ, et al. Long non-coding RNA FLVCR1-AS1 sponges miR-155 to promote the tumorigenesis of gastric cancer by targeting c-Myc[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(2): 793-805.
- [16] Lin H, Shanguan Z, Zhu M, et al. LncRNA FLVCR1-AS1 silencing inhibits lung cancer cell proliferation, migration, and invasion by inhibiting the activity of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 10625-10632.
- [17] Xie H, Shi S, Chen Q, et al. LncRNA TRG-AS1 promotes glioblastoma cell proliferation by competitively binding with miR-877-5p to regulate SUZ12 expression[J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(8): 152476.
- [18] Yan TH, Qiu C, Sun J, et al. MiR-877-5p suppresses cell growth, migration and invasion by targeting cyclin dependent kinase 14 and predicts prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(10): 3038-3046.

收稿日期: 2021-03-21 修回日期: 2021-05-28 编辑: 王娜娜