

宫颈癌组织中 YB-1、miR-29a、Nek2 的表达与细胞增殖、侵袭基因的相关性

周 园¹, 杜丽辉², 张 娟¹

(1. 宜昌市妇幼保健院, 湖北 宜昌 443000; 2. 湖北三峡职业技术学院附属医院, 湖北 宜昌 443000)

摘 要: [目的] 评价宫颈癌组织中 YB-1、miR-29a、Nek2 表达与细胞增殖、侵袭基因的相关性。[方法] 选取 2017 年 1 月至 2018 年 1 月我院收治的宫颈癌患者 60 例, 取宫颈癌患者手术切除癌组织及癌旁组织标本, 检测癌组织、癌旁组织中 YB-1、miR-29a、Nek2、细胞增殖基因和细胞侵袭基因表达情况。[结果] 癌组织中 YB-1 mRNA、Nek2 mRNA 表达量为 $(1.52 \pm 0.36, 1.96 \pm 0.35)$ 高于癌旁组织 $(1.00 \pm 0.10, 1.00 \pm 0.13)$, miR-29a mRNA 表达量为 (0.98 ± 0.10) 低于癌旁组织 (1.06 ± 0.23) (P 均 < 0.05)。癌组织细胞增殖基因 YAP1 mRNA、Pwll2 mRNA、EZH2 mRNA、PKC ϵ mRNA 表达量高于癌旁组织 (P 均 < 0.05)。癌组织细胞侵袭基因 Rab11 mRNA、TUG1 mRNA、Gli1 mRNA、FoxM1 mRNA 表达量高于癌旁组织 (P 均 < 0.05)。[结论] YB-1、Nek2 在宫颈癌组织中高表达, miR-29a 在宫颈癌组织中低表达, 且与癌组织增殖、侵袭基因相关, 其表达异常可促进细胞增殖、侵袭。

关键词: 宫颈癌; 细胞增殖; 细胞侵袭

中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2020)03-0190-04
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.03.B005

Expression of YB-1, miR-29a and Nek2 in Cervical Cancer and Its Relation with Cell Proliferation and Invasion

ZHOU Yuan¹, DU Li-hui², ZHANG Juan¹

(1. Yichang Maternal and Child Health Hospital, Yichang 443000, China; 2. Dhubei Three Gorges Polytechnic Affiliated Hospital, Yichang 443000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of YB-1, miR-29a, Nek2 in cervical cancer and its relation with cell proliferation and invasion. [Methods] Sixty patients with cervical cancer admitted to our hospital from January 2017 to January 2018 were recruited. The mRNA expression of cell proliferation-related genes YAP1, Pwll2, EZH2, PKC ϵ and cell invasive related-genes Rab11, TUG1, Gli1, FoxM1 in cancer tissues and adjacent tissues were detected by RT-PCR. [Results] The expression of YB-1 mRNA and Nek2 mRNA in cancer tissues was higher than that in adjacent tissues, and the expression of miR-29a mRNA was lower than that in adjacent tissues (P all < 0.05). The expression levels of Yap1 mRNA, PIWIL2 mRNA, EZH2 mRNA and PKC ϵ mRNA in cancer tissue were higher than that in adjacent tissue (all $P < 0.05$). The expression levels of Rab11 mRNA, tug1 mRNA, Gli1 mRNA and FoxM1 mRNA in cancer tissues were higher than those in adjacent tissues (P all < 0.05). [Conclusion] Cell proliferation and invasion genes YB-1 and Nek2 are highly expressed, miR-29a is low expressed in cervical cancer, which can promote cell proliferation and invasion.

Subject words: cervical cancer; cell proliferation; cell invasion

宫颈癌的发生与多种因素相关, 其临床症状主要表现为阴道出血、接触性出血、分泌物增加, 且会侵犯周围器官^[1]。目前临床上宫颈癌诊断缺乏特异性诊断指标, 导致多数患者在疾病确诊时已经处于中晚期, 严重影响着患者的生命。因此, 寻找特异性诊断宫颈癌尤为重要。本文研究分析宫颈癌组织中

YB-1、miR-29a、Nek2 的表达与细胞增殖和侵袭的相关性, 为临床上宫颈癌的早期诊断提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2017 年 1 月至 2018 年 1 月我院收治的宫颈癌。纳入标准: 病理学确诊为宫颈癌, 均未接受过

通信作者: 周园, 副主任医师, 本科; 宜昌市妇幼保健院妇科, 湖北省宜昌市夷陵大道 148 号 (443000), E-mail: 1327984384@qq.com
收稿日期: 2019-10-23; 修回日期: 2019-12-04

放疗、化疗、免疫治疗。排除标准:(1)合并其他肿瘤的患者;(2)存在宫颈手术史的患者;(3)合并全身感染性疾病的患者;(4)心、肺功能不全的患者;(5)病历资料不全患者。研究患者及其家属均知情,签署知情通知书,并经医院伦理委员会批准。入组患者 60 例,年龄 40~65 岁,平均年龄(52.6±1.4)岁,疾病分期:I a 期 15 例,I b 期 20 例,II a 期 17 例,II b 期 8 例。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集

取宫颈癌患者手术切除癌组织及癌旁组织标本,将组织标本采用 40g/L 多聚甲醛进行固定,并进行常规石蜡包埋,厚度 3μm,连续切片作免疫组化标记。

1.2.2 免疫组化

将石蜡切片在二甲苯中重复脱蜡处理 10min,行梯度酒精水化,将蛋白酶修复液加入温度 37℃的恒温冰箱中行孵化处理,孵化处理 30min,去除抗原修复液,将所制备的切片转移至内含 3% H₂O₂ 湿盒中,密封(去过氧化物酶封闭液),在温度 37℃恒温冰箱中行孵化处理,孵化处理 10min,使用 PBS 清洗。清洗完成后将山羊血清加入,在室温下封闭处理,处理 30min,将封闭液吸出(滤纸),加入一抗,放入至适合后加入二抗,在室温下孵育处理,处理 1h,运用 PBS 清洗,行 DAB 显色处理 10min,采用梯度乙醇进行脱水,采用二甲苯冲洗片 3 次一直到透明,采用中性树脂封片处理,显微镜下观察免疫组化染色情况。每份标本在镜头下随机选择 5 个视野,病理切片均由两位以上经验丰富的医师采用双盲法进行确诊。阳性细胞标准:细胞核出现棕黄色或者棕褐色颗粒,YB-1、miR-29a、Nek2 均已阳性细胞>10%为阳性。

1.2.3 YB-1、miR-29a、Nek2、细胞增殖基因、细胞侵袭基因表达量检测

采用实时荧光定量 RT-PCR 检测癌组织、癌旁组织中 YB-1、miR-29a、Nek2、细胞增殖基因、细胞侵袭基因表达量。取癌组织、癌旁组织,加入 1ml Trizol 研磨为粉末状,按照制备试剂盒说明书提取胎盘组织中总 RNA,之后对 RNA 纯度、含量进行检测,使用 Takara 逆转录试剂盒行逆转录处理后获得 cDNA,之后使用 Primer5.0 软件对引物序列进行设计,

使用实时 RT-PCR 方法检测癌组织、癌旁组织中 YB-1、miR-29a、Nek2、细胞增殖基因 YAP1、Pitil2、EZH2、PKCε、细胞侵袭基因 Rab11、TUG1、Gli1、FoxM1 表达量,采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算表达量。

YB-1 引物序列:上游:5'-GCTGACCATGCAACT-3',下游:5'-TGTGCCGTAGCACACAGTA-3'; miR-29a 引物序列:上游:5'-CGCGGATCCATGCTTAAAGAGCC-3',下游:5'-CCCAAGCTTTCAGTATAACCATTC-3'; Nek2 引物序列:上游:5'-ACCATTGGCACAGGCTCCTAC-3',下游:5'-GTTTCAGTTCACGAAGCAAATTCAC-3'; YAP1 引物序列:上游:5'-GCTGACCATGCAACTTAGC-3',下游:5'-TGTGCCGTAGCACACAGTA-3'; Pitil2 引物序列:上游:5'-GTGCCAGAAACCGTTGAATC-3',下游:5'-TTGTGTTCTGTGCCTCGTT-3'; EZH2 引物序列:上游:5'-GCCAGACTGGGAGAAATCTG-3',下游:5'-TGTGTTGGA-AAATCCAAGTCA-3'; PKCε 引物序列:上游:5'-AAGTTGTATGCGTTTGTATCTC-3',下游:5'-TTCTCACCGTGTATTAGCC-3'; Rab11 引物序列:上游:5'-TGATGCCCTGATGAACTGAT-3',下游:5'-TGTCAACATGCAAACTGTG-3'; TUG1 引物序列:上游:5'-TGACCTGAACCGTAGTAGA-3',下游:5'-TGCGAACTGAACGATGAC-3'; Gli1 引物序列:上游:5'-TGCCTGTACCCTCCTCCCGAA-3',下游:5'-GCGATCTGTGATGGATGAGATTCCC-3'; FoxM1 引物序列:上游:5'-ACCTTACCATGACACAACGTA-3',下游:5'-TGCTTGAACGTTGACAGTACTA-3'; 内参基因 GAPDH 引物序列:上游:5'-AACAGCCTCAAGATCATCAGCAA-3',下游:5'-GACTGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'。

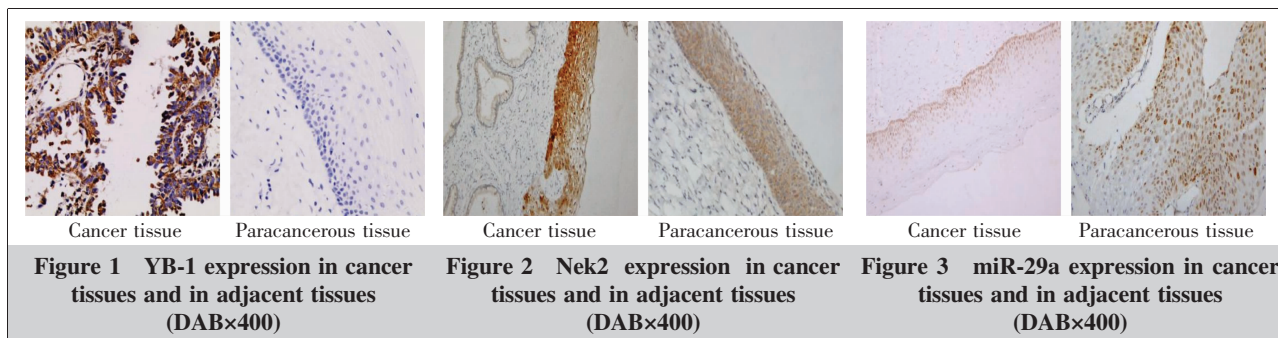
1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,组间比较采用独立样本 *t* 检验,计数资料采用频数和百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验,相关性采用 Pearson 相关性分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 YB-1、miR-29a、Nek2 表达量比较

癌组织中 YB-1 mRNA、Nek2 mRNA 表达量高于癌旁组织,miR-29a mRNA 表达量低于癌旁组织



($P < 0.05$) (Table 1, Figure 1~3)。

2.2 细胞增殖基因表达比较

癌组织细胞增殖基因 YAP1 mRNA、Piwil2 mRNA、EZH2 mRNA、PKC ϵ mRNA 表达量高于癌旁组织 ($P < 0.05$) (Table 2)。

2.3 细胞侵袭基因表达量比较

癌组织细胞侵袭基因 Rab11 mRNA、TUG1 mRNA、Gli1 mRNA、FoxM1 mRNA 表达量高于癌旁组织,具有统计学差异 ($P < 0.05$) (Table 3)。

2.4 YB-1、miR-29a、Nek2 间相关性分析

YB-1 与 miR-29a 之间呈负相关 ($r = -0.168, P = 0.024$), YB-1 与 Nek2 之间呈正相关 ($r = 0.352, P = 0.019$), miR-29a 与 Nek2 之间呈负相关 ($r = -0.546, P = 0.003$)。

3 讨论

大多数恶性肿瘤患者死亡与癌细胞增殖、转移、侵袭等细胞生物学行为相关。YAP1、Piwil2、EZH2、PKC ϵ 属于较为常用的评价细胞增殖的基因, YAP1、Piwil2、EZH2、PKC ϵ 与癌细胞增殖正相关, 当上述基因异常高表达时, 癌细胞增殖能力较强, 可促进癌细胞增殖。YAP1 属于一种 Hippo-YAP1 信号转导通路的下游转录因子, 沉默 Piwil2 可抑制癌细胞增殖^[2]。EZH2 通过作用于染色质中的靶基因, 通过对其产生抑制作用, 来调控细胞增殖, PKC ϵ 促进癌细胞增

Table 1 Comparison of YB-1, miR-29a, Nek2 expression in cancer tissues and in adjacent tissues ($\bar{x} \pm s$)

Tissue	N	YB-1 mRNA	miR-29a mRNA	Nek2 mRNA
Cancer tissue	60	1.52 $\pm$ 0.36	0.98 $\pm$ 0.10	1.96 $\pm$ 0.35
Paracancerous tissue	60	1.00 $\pm$ 0.10	1.06 $\pm$ 0.23	1.00 $\pm$ 0.13
<i>t</i>		10.780	2.471	19.920
<i>P</i>		<0.001	0.015	<0.001

Table 2 Comparison of YAP1, Piwil2, EZH2, PKC ϵ mRNA in cancer tissues and in adjacent tissues ($\bar{x} \pm s$)

Tissue	N	YAP1 mRNA	Piwil2 mRNA	EZH2 mRNA	PKC ϵ mRNA
Cancer tissue	60	1.53 $\pm$ 0.25	2.16 $\pm$ 0.37	1.58 $\pm$ 0.26	2.15 $\pm$ 0.26
Paracancerous tissue	60	0.80 $\pm$ 0.12	1.15 $\pm$ 0.21	0.86 $\pm$ 0.05	1.02 $\pm$ 0.12
<i>t</i>		20.390	18.390	21.060	30.570
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Table 3 Comparison of Rab11, TUG1, Gli1, FoxM1 in cancer tissues and in adjacent tissues ($\bar{x} \pm s$)

Tissue	N	Rab11 mRNA	TUG1 mRNA	Gli1 mRNA	FoxM1 mRNA
Cancer tissue	60	1.98 $\pm$ 0.24	1.65 $\pm$ 0.34	1.86 $\pm$ 0.24	2.10 $\pm$ 0.50
Paracancerous tissue	60	1.00 $\pm$ 0.08	0.98 $\pm$ 0.10	0.75 $\pm$ 0.08	1.03 $\pm$ 0.13
<i>t</i>		30.010	14.640	33.990	16.040
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

殖与 PI3K/Akt、MAPK 等信号转导通路相关^[3]。Rab11、TUG1、Gli1、FoxM1 是用于评价癌细胞侵袭的常用基因, Rab11、TUG1、Gli1、FoxM1 与癌细胞侵袭正相关, 当上述基因异常高表达时, 癌细胞侵袭能力较强, 可促进癌细胞侵袭, 其中 Rab11 可通过调节细胞周期、肌动蛋白骨架重组直接参与癌细胞侵袭, 当 TUG1 表达沉默后可降低癌细胞侵袭能力^[4]。Gli1、FoxM1 与宫颈癌细胞侵袭相关, 当其表达上升后会进一步促进癌细胞侵袭, 肿瘤进一步恶化。

YB-1 广泛存在于哺乳动物细胞核、细胞质中, 参与机体多种生理过程, 包括基因翻译、转录、细胞增殖、细胞再生、DNA 损伤诱导修复等, 作为细胞周期的正向调控因子, 参与多种肿瘤的发生发展, 可促进癌细胞增殖, 抑制癌细胞凋亡^[5]。廖雪等^[6]研究认

为,YB-1 在宫颈鳞状细胞癌组织中高表达,参与肿瘤的发生和发展。另外梁晓燕等^[7]研究证实,宫颈鳞状细胞癌组织中 YB-1 蛋白异常高表达。本文研究显示,宫颈癌组织中 YB-1 表达量显著性高于癌旁组织,YB-1 与癌细胞增殖、侵袭呈正相关,当 YB-1 表达异常升高后,会促进癌细胞增殖、侵袭,进一步使疾病恶化。

miRNA 属于一组内源性非编码蛋白质的单链 RNA,可与其靶基因相结合并调控靶基因的表达,参与机体免疫应答、炎症反应、细胞增殖、细胞凋亡等过程^[8]。miR-29a 属于 miR-29 家族成员,在人染色体 7q32.3 负链上定位。目前研究认为,miR-29a 在部分恶性肿瘤中呈现为异常低表达,可能参与肿瘤的发生发展^[9]。miR-29a 在宫颈癌组织中低表达,且对其进行上调处理后,可抑制癌细胞的增殖、侵袭,加速癌细胞凋亡^[10]。miR-29a 在宫颈癌组织中显著性低于癌旁组织,与癌细胞增殖基因、侵袭基因均呈负相关,结果提示 miR-29a 参与宫颈癌的发生,低表达可促进肿瘤进一步恶化。

Nek 激活属于一种 NIMA 相关蛋白激酶。Nek2 一方面可通过作用于细胞中心体参与细胞分裂过程的调控,另一方面可通过染色质直接调控细胞分裂。研究发现,Nek2 异常表达与中心体功能异常具有一定的相关性,当其发生异常表达后会使整个基因组失控,导致细胞向恶性方向转化。本文研究显示,宫颈癌组织中 Nek2 表达量显著性高于癌旁组织,Nek2 与癌细胞增殖、侵袭呈正相关,当 Nek2 表达异常后,改变基因组,促进癌细胞增殖、侵袭。

综上所述,YB-1、Nek2 在宫颈癌组织中高表达,miR-29a 在宫颈癌组织中低表达,且与癌细胞增殖、侵袭相关,其表达异常可促进细胞增殖和侵袭。

参考文献:

- [1] Yan Z,Zhou Z,Li C,et al. Polymorphisms in miRNA genes play roles in the initiation and development of cervical cancer[J]. J Cancer,2019,10(20):4747-4753.
- [2] Feng DQ,Yan KJ,Zhang X,et al. The mechanism of Piwi2 regulating the malignant biological behavior of cervical cancer cells [J]. Chinese Journal of Cancer,2017,27(12):921-927. [冯定庆,闫克芹,张筱,等. Piwi2 调控宫颈癌

细胞恶性生物学行为的机制探讨[J]. 中国癌症杂志,2017,27(12):921-927.]

- [3] Li CM,Zhang QS,Gao TY,et al. Effect of PKCε-siRNA on proliferation and invasion of human cervical cancer cell line ME180 [J]. J Pract Obstet Gynecol,2015,31(1):57-60. [李春梅,张秋实,高天旸,等. PKCε-siRNA 对宫颈癌 ME180 细胞增殖与侵袭能力影响的实验研究[J]. 实用妇产科杂志,2015,31(1):57-60.]
- [4] Hui H,Wu L,Zhou YS,et al. Effect of silence of TUG on proliferation,apoptosis and invasion of Hela cells [J]. Modern Oncology,2016,24(12):1876-1878. [惠慧,吴磊,周云松,等. 沉默 TUG1 对宫颈癌 Hela 细胞增殖、凋亡、侵袭的影响[J]. 现代肿瘤医学,2016,24(12):1876-1878.]
- [5] Li M,Guan H,Hu XR,et al. Correlation between the up-regulation of twist and YB-1 gene expression and the epithelial stromal transformation of cervical cancer[J]. Chinese Journal of Pathology,2015,44(8):594-599. [李旻,关弘,胡新荣,等. Twist 及 YB-1 基因表达上调与子宫颈癌上皮间质转化的相关性[J]. 中华病理学杂志,2015,44(8):594-599.]
- [6] Liao X,Ren QC. Expression and clinical significance of YB-1 protein in cervical squamous cell carcinoma [J]. Chongqing Medicine,2017,46(6):777-779. [廖雪,任黔川. YB-1 蛋白在宫颈鳞状细胞癌组织中的表达及临床意义[J]. 重庆医学,2017,46(6):777-779.]
- [7] Liang XY,Yao MF,Yao H,et al. Expression and clinical significance of twist and YB-1 protein in cervical squamous cell carcinoma[J]. Shanxi Medical Journal,2015,44(16):1875-1877. [梁晓燕,姚孟飞,姚宏,等. Twist 和 YB-1 蛋白在宫颈鳞状细胞癌中的表达与临床意义[J]. 山西医药杂志,2015,44(16):1875-1877.]
- [8] Huang ZS,Ren QC. Expression of miR-29a in cervical cancer and its up-regulation effect on malignant biological behavior of cervical cancer cells[J]. Chinese Journal of Modern Medicine,2017,27(18):22-27. [黄智述,任黔川. miR-29a 在宫颈癌组织中的表达及其上调后对宫颈癌细胞恶性生物学行为的影响 [J]. 中国现代医学杂志,2017,27(18):22-27.]
- [9] Gong Y,Wan JH,Zou W,et al. MiR-29a inhibits invasion and metastasis of cervical cancer via modulating methylation of tumor suppressor SOCS1[J]. Future Oncol,2019,15(15):1729-1744.
- [10] Chen R,Zhang L. MiR-29a inhibits cell proliferation and migration by targeting the CDC42/PAK1 signaling pathway in cervical cancer[J]. Anticancer Drugs,2019,30(6):579-587.