

# miR-125a-5p 对子宫内膜癌 RL95-2 细胞增殖凋亡的影响

毛小梅, 马园园, 周 宓, 郝小华, 黄 明, 陈必良\*

(空军军医大学西京医院, 陕西 西安 710032)

**[摘要]** 目的: 探讨 miR-125a-5p 对子宫内膜癌 RL95-2 细胞增殖、凋亡的影响及可能作用机制。方法: 取对数生长期 RL95-2 细胞随机分为未转染组、mimic 阴性对照组和 mimic 转染组, 做相应处理后 24 h, 采用 Real-time PCR 检测 miR-125a-5p 表达, MTT 检测细胞增殖, 流式细胞术分析细胞凋亡, Western blot 检测凋亡相关蛋白 (Bcl-2、Bax、cleaved caspase3、cytochrome C) 和信号通路相关蛋白 (p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR) 的表达。结果: 同 mimic 阴性对照组比较, mimic 转染组中 miR-125a-5p 表达显著增加, 细胞增殖抑制率和细胞凋亡率明显升高, Bax、cleaved caspase3 表达水平显著上调, Bcl-2 和线粒体 cytochrome C、p-AKT、p-mTOR 的表达水平明显下降。结论: miR-125a-5p 能够抑制子宫内膜癌 RL95-2 细胞增殖, 机制可能与其改变 PI3K/AKT/mTOR 通路活性及调节凋亡相关基因有关。

**[关键词]** miR-125a-5p; 子宫内膜癌; RL95-2 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R737.33; R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)11-1279-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.11.007

## The Effects of MiR-125a-5p on Proliferation and Apoptosis of Endometrial Carcinoma RL95-2 Cells and Correlated Mechanism

MAO Xiaomei, MA Yuanyuan, ZHOU Mi, HAO Xiaohua, HUANG Ming, CHEN Biliang  
(Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

**[Abstract] Objective:** To explore the effect and the mechanism of miR-125a-5p on proliferation and apoptosis in endometrial carcinoma RL95-2 cells, and to provide a new target for the clinical treatment of the disease. **Methods:** Human endometrial carcinoma RL95-2 cells in logarithmic growth period were randomly divided into three groups: untransfected control group, mimic negative control group, mimic transfected group. The Real-time PCR was used to detect expression of miR-125a-5p. MTT assay was used to assess cell proliferation. Flow cytometry was used to analyze cell apoptosis. Western blot was employed to test expressions of apoptotic proteins (bcl-2, Bax, cleaved caspase3, cytochrome C) and signaling pathway-related proteins (p-akt, AKT, p-mtor, mTOR). **Results:** The expression level of miR-125a-5p significantly increased in mimic transfected group compared with mimic negative control group. Similarly, the inhibitory rates of proliferation and apoptotic rates were increased, the expression of Bax and cleaved caspase3 were markedly up-regulated, and the expression of Bcl-2, mitochondria cytochrome C, p-AKT and p-mTOR were down-regulated. **Conclusion:** MiR-125a-5p can inhibit the proliferation of endometrial carcinoma RL95-2 cells, the mechanism may be related to its effects of changing PI3K/AKT/mTOR pathway activity and regulating the apoptosis-related gene.

**[Key words]** MiR-125a-5p; endometrial carcinoma; RL95-2 cells; proliferation; apoptosis

\* 通信作者 E-mail: cblxjh@fmmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-11-15 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181115.2126.014.html>

子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)是女性生殖道常见恶性肿瘤之一,其发病率呈逐年上升趋势,严重威胁女性健康<sup>[1]</sup>。虽然近年对EC的诊断和治疗取得了巨大进步,但由于病理机制不明确,晚期患者5年生存率仅为10%~29%<sup>[1]</sup>。因此深入探索EC的发病机制、寻找基因治疗的潜在靶点,很可能成为治疗及改善EC癌患者预后的新突破口。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长度约为22个碱基的非编码RNA分子,参与细胞分化、增殖、凋亡、迁移等多种生命活动,与肿瘤进展紧密相关。miR-125a-5p近年来备受关注,对肺癌<sup>[2]</sup>、乳腺癌<sup>[3]</sup>、宫颈癌<sup>[4]</sup>、结直肠癌<sup>[5]</sup>等肿瘤的影响及作用机制已经日渐清晰,但miR-125a-5p与子EC的相关研究甚少,仅有的资料显示,miR-125a-5p在EC临床组织样本和细胞系中的表达显著下降<sup>[6]</sup>,提示miR-125a-5p参与EC的发生和进展。因此本研究通过观察miR-125a-5p对子宫内膜癌RL95-2细胞增殖和凋亡的影响,探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与主要试剂

人EC细胞RL95-2、DMEM/F12购自上海中乔新舟公司,脂质体2000购自Invitrogen公司,胰酶、MTT购自上海碧云天公司,TRIpure、Super M-MLV反转录酶、RNase inhibitor、2×Power Taq PCR MasterMix购自北京百泰克公司,SYBR Green购自北京索莱宝公司,全蛋白提取试剂盒、线粒体蛋白提取试剂盒、一抗二抗去除液、Western洗涤液、ECL发光液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒、Bcl-2抗体、Bax抗体、cleaved caspase3抗体、p-AKT抗体、AKT抗体、mTOR抗体、羊抗兔IgG-HRP、内参抗体β-actin、线粒体内参VDAC1购自沈阳万类生物公司,PVDF膜购自Millipore公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与转染** 将RL95-2细胞接种于含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养,根据细胞生长状态适时换液,使细胞处于对数期。将细胞分为未转染组(Control组)、mimic阴性对照组(mimic-NC组)和mimic转染组(mimic组),由苏州吉玛公司合成

miR-125a-5p mimic和阴性对照,按照脂质体2000说明书将转染试剂和待转染序列滴入培养孔中,轻轻混匀,培养6h后更换为完全培养基继续培养至指定时间。

**1.2.2 Real-time PCR检测miR-125a-5p的表达** 转染24h后收集各组细胞,TRIpure法提取总RNA,紫外分光光度计测定RNA浓度,根据说明书将RNA反转录成cDNA。配制Real-time PCR反应体系:cDNA模板(1μL)、10μmol/L上游引物(0.5μL)、10μmol/L下游引物(0.5μL)、SYBR GREEN mastermix(10μL),用ddH<sub>2</sub>O补足至20μL,在Exicycler™96荧光定量仪上进行荧光定量分析。PCR反应条件为:94℃5min,94℃10s、60℃20s、72℃30s,共40个循环,记录循环阈值(cycle threshold, Ct),以U6作为内参,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算目的基因的相对表达水平。miR-125a-5p上游引物为5'-CCGTCCCTGAGACCCTTTAAC-3',miR-125a-5p下游引物为5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'。

**1.2.3 MTT检测细胞增殖** 将RL95-2细胞接种于96孔板培养至对数期,进行细胞转染(方法同1.2.1),继续培养24h、48h、72h、96h,更换为含有0.5g/L MTT的培养液,于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下继续孵育4h,去除上清液,向培养板内加入DM-SO(150μL),避光孵育10min(溶解细胞形成的紫色结晶),酶标仪测定各组细胞在570nm处的OD值,以时间点为横坐标,OD值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡** 将RL95-2细胞接种于6孔板培养至对数期,进行细胞转染(方法同1.2.1),继续培养48h,收集各组细胞,PBS缓冲液洗涤细胞2次,向细胞沉淀内加入Binding Buffer(500μL)轻轻吹打悬浮细胞,依次加入5μL Annexin V-Light 650和Propidium Iodide(10μL),每加完一种试剂需轻轻混匀,于室温下避光静置15min,上样,流式细胞仪分析细胞凋亡。

**1.2.5 Western blot检测蛋白表达** 将细胞接种于6孔板培养至对数期,进行细胞转染(方法同1.2.1),继续培养48h,收集各组细胞,PBS清洗后加入裂解液提取样本总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,稀释后煮沸变性,取20μL(含40μg蛋白)上样,SDS-PAGE恒压电泳2.5h,将蛋白转印到PVDF膜上,加入5%(M/V)脱脂奶粉,摇床缓慢摇动1h,4℃过夜孵育一抗(Bcl-2、Bax、cleaved

caspase3、cytochrome C、p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR、 $\beta$ -actin, 1:500), 洗膜后加入二抗(羊抗兔 IgG-HRP, 1:5000), 37 °C 孵育 45 min, 加入 ECL 化学发光试剂, 静置 5 min, 转移到暗室内曝光, 凝胶成像系统显影并拍照, 分析目标条带的光密度值。

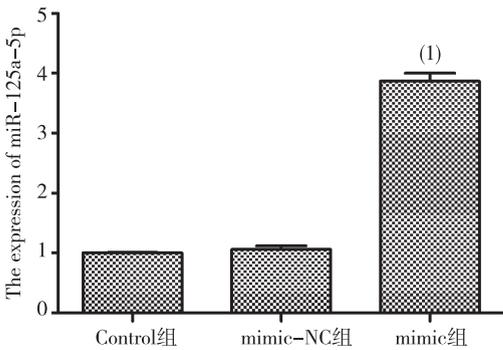
1.3 统计学方法

所有数据用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 实验结果用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间数据比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-125a-5p 的表达

从图 1 可以看出, 与 Control 组比较, mimic-NC 组中 miR-125a-5p 的表达未发生显著变化, 而 mimic 组中 miR-125a-5p 的表达较 mimic-NC 组显著升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 表明 miR-125a-5p mimic 转染成功。



(1) 与 mimic-NC 组比较,  $P < 0.01$

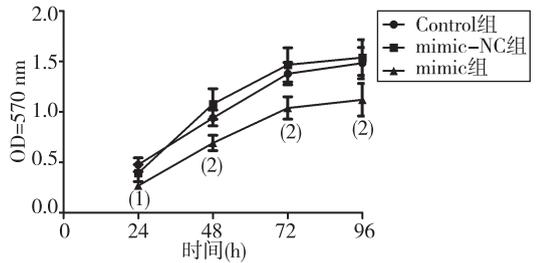
图 1 miR-125a-5p 表达 (Real-time PCR)

Fig. 1 miR-125a-5p expression in RL95-2 cell

2.2 miR-125a-5p 对细胞增殖的影响

MTT 法检测结果显示 (图 2), 转染 miR-125a-

5p 后, mimic 组中细胞在各个时间点的增殖率较 mimic-NC 组均显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 同 Control 组比较, mimic-NC 组细胞的增殖能力未发生明显变化, 说明 miR-125a-5p 显著抑制 EC 细胞 RL95-2 增殖。



与 mimic-NC 组比较, (1)  $P < 0.05$ , (2)  $P < 0.01$

图 2 RL95-2 细胞增殖能力 (MTT 法)

Fig. 2 RL95-2 cell proliferation ability

2.3 miR-125a-5p 对细胞凋亡率的影响

转染 48 h 后, 流式细胞术检测细胞凋亡, 结果显示 (图 3), Control 组、mimic-NC 组、mimic 组细胞早期凋亡率分别为 4.9%、5.4% 和 17.3%, mimic 组细胞凋亡率较 mimic-NC 组明显升高, 说明 miR-125a-5p 显著诱导 EC 细胞 RL95-2 凋亡。

2.4 miR-125a-5p 对凋亡相关蛋白的影响

转染 48 h 后, Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、cleaved caspase3、cytochrome C 的表达。与 mimic-NC 组比较, 促凋亡蛋白 Bax、cleaved caspase3 的表达显著增加, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 和线粒体 cytochrome C 的表达显著减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 而 mimic-NC 组中各指标的表达较 Control 组未发生明显变化 (图 4), 表明 miR-125a-5p 显著增加促凋亡蛋白表达, 减少抗凋亡蛋白表达, 从而诱导 EC 细胞 RL95-2 凋亡。

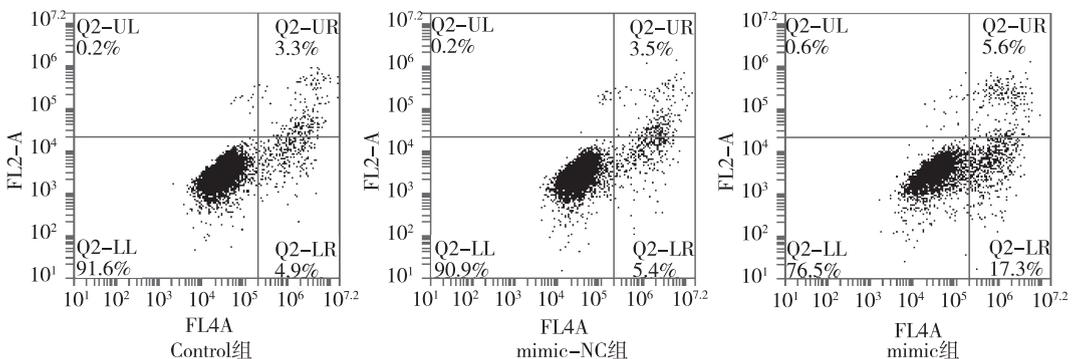
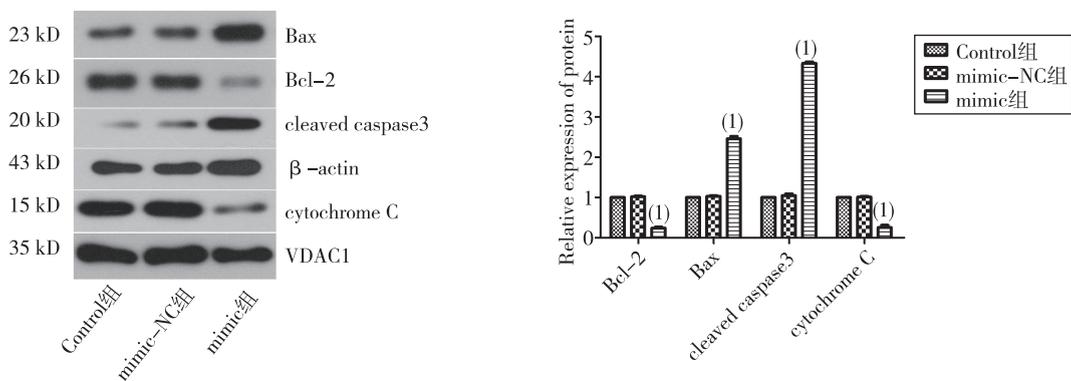


图 3 RL95-2 细胞凋亡 (Annexin V/PI 双染流式细胞术)

Fig. 3 RL95-2 cell apoptosis condition



与 mimic-NC 组比较, <sup>(1)</sup> $P < 0.01$

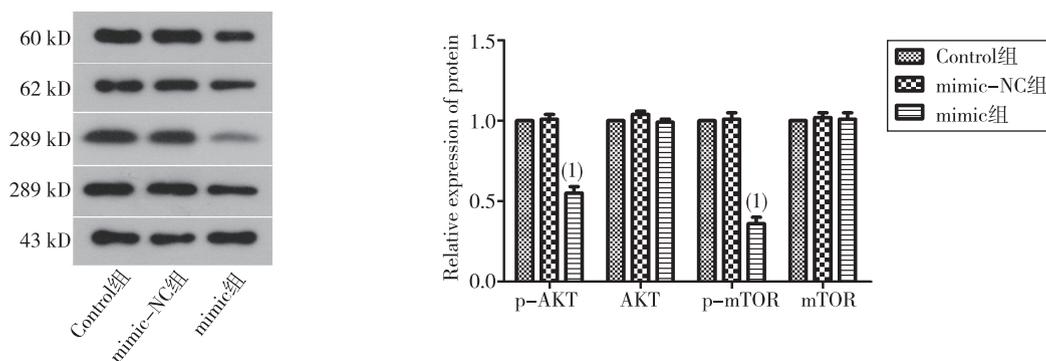
图4 miR-125a-5p 对凋亡相关蛋白的影响 (Western blot)

Fig. 4 Bcl-2, Bax, cleaved caspase3 and cytochrome C protein expression levels in RL95-2 cell in each group

### 2.5 miR-125a-5p 对 PI3K/AKT/mTOR 通路的影响

转染 48 h 后, Western blot 检测通路相关蛋白 p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR 的表达, 从图 5 可以看出, AKT 和 mTOR 在各组中的蛋白水平均未发生显著变化, 与 mimic-NC 组比较, mimic 组中 p-

AKT 和 p-mTOR 的表达显著减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 而 mimic-NC 组中两指标的表达较 Control 组未发生明显变化, 说明 miR-125a-5p 显著抑制 EC 细胞 RL95-2 中 PI3K/AKT/mTOR 通路活性。



与 mimic-NC 组比较, <sup>(1)</sup> $P < 0.01$

图5 miR-125a-5p 对信号通路相关蛋白的影响 (Western blot)

Fig. 5 p-AKT, AKT, p-mTOR and mTOR protein expression levels in RL95-2 cell in each group

## 3 讨论

MiRNA 是人体内最大种类的调控因子, 在癌症发生进展中的作用是目前的研究热点。新近研究发现, miR-125a-5p 在肿瘤进展中发挥重要作用: 如 miR-125a-5p 在胃癌临床组织样本和细胞系中的表达显著减少, 与肿瘤发生和预后不良紧密相关<sup>[7]</sup>; miR-125a-5p 通过靶向 GALNT14 抑制卵巢癌细胞增殖和侵袭<sup>[8]</sup>。但有关 miR-125a-5p 与 EC 的关系显见报道, Jayaraman 等<sup>[6]</sup>的研究指出, EC 组织和肿瘤细胞中 miR-125a-5p 的表达显著减少, 但其对 EC 生物学行为的影响目前尚无文献报道。

本研究通过向 EC 细胞 RL95-2 转染 miR-125a-5p mimic 进一步研究上调 miR-125a-5p 对细胞增殖和凋亡的影响。为了确定转染后 miR-125a-5p 的表达增加, 本研究采用 Real-time PCR 技术进行验证, 结果 mimics 组较 mimic-NC 组和 Control 明显升高, 表明转染成功, 可用于后续实验。有文献报道, miR-125a-5p 直接靶向 NEDD9 抑制肺腺癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡<sup>[9]</sup>; Tong 等<sup>[10]</sup>的研究证实, Bcl-2、Bcl2L12 及 Mcl-1 是 miR-125a-5p 的下游靶基因, 将其过表达后可以拮抗 miR-125a-5p 对结直肠癌细胞增殖的抑制作用, 提示 miR-125a-5p 在肿瘤中发挥抑癌作用。本实验采用 MTT 和流式细胞术分别检测细胞增殖与凋亡情况, 结果显示, 上调

miR-125a-5p 可显著抑制 RL95-2 细胞增殖,促进细胞凋亡。应用 Western blot 技术进一步检测凋亡相关指标,综合分析 miR-125a-5p 对 RL95-2 细胞凋亡的影响,结果发现 miR-125a-5p 过表达后 Bax、cleaved caspase3 的表达显著增加,Bcl-2 和线粒体 cytochrome C 的表达明显减少,进一步证明了 miR-125a-5p 诱导 EC 细胞 RL95-2 凋亡。PI3K/AKT/mTOR 该信号通路的活化对 Bax、Bcl-2、caspase3、caspase9 等多种促凋亡因子的表达具有调控作用<sup>[11]</sup>。近年研究表明 PI3K/AKT/mTOR 信号通路活性增强及相关信号蛋白表达增加与 EC 的发生进展密切相关<sup>[12]</sup>。已有文献报道,PI3K/AKT/mTOR 信号通路是 EC 中常见异常表达通路,在 EC 组织中的活性明显高于正常子宫内膜组织和非典型增生子宫内膜组织<sup>[13]</sup>;此外,Tang 等<sup>[14]</sup>的研究指出,miR-125a-5p 通过调控 PI3K/AKT/mTOR 通路活性抑制肝癌细胞侵袭和迁移。因此推测 PI3K/AKT/mTOR 信号通路很可能参与 miR-125-5p 对 EC 的调控作用。本研究采用 miR-125-5p mimic 转染 RL95-2 细胞后,应用 Western blot 技术检测信号通路相关蛋白 AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 的表达,发现 miR-125a-5p mimic 能够显著降低 p-AKT 和 p-mTOR 的含量,而 AKT 和 mTOR 的含量未受到显著影响。说明 miR-125a-5p 抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路活性,与 Bu 等<sup>[15]</sup>在甲状腺未分化癌中的研究结果一致。

综上所述,miR-125a-5p 在 EC 中呈低表达,通过影响 PI3K/AKT/mTOR 通路活性调节凋亡相关因子,抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡,参与 EC 的发生与进展,有可能成为临床 EC 基因治疗的潜在靶点,但 miR-125a-5p 可能作用的靶基因仍有待进一步研究。

## 4 参考文献

- [1] XIE W, QIN W, KANG Y, et al. MicroRNA-340 Inhibits Tumor Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Endometrial Carcinoma Cell Line RL 95 - 2 [J]. *Med Sci Monit*, 2016,22:1540 - 1546.
- [2] HOU L, LUO P, MA Y, et al. MicroRNA-125a-3p down-regulation correlates with tumorigenesis and poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017,14(4):4441 - 4448.
- [3] ZHENG L, MENG X, LI X, et al. miR-125a-3p inhibits ERalpha transactivation and overrides tamoxifen resistance by targeting CDK3 in estrogen receptor-positive breast cancer [J]. *FASEB J*, 2018,32(2):588 - 600.
- [4] FAN Z, CUI H, YU H, et al. MiR-125a promotes paclitaxel sensitivity in cervical cancer through altering STAT3 expression [J]. *Oncogenesis*, 2016,5:e223.
- [5] LIANG L, GAO C, LI Y, et al. miR-125a-3p/FUT5-FUT6 axis mediates colorectal cancer cell proliferation, migration, invasion and pathological angiogenesis via PI3K-Akt pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2017,8(8):e2968.
- [6] JAYARAMAN M, RADHAKRISHNAN R, MATHEWS CA, et al. Identification of novel diagnostic and prognostic miRNA signatures in endometrial cancer [J]. *Genes Cancer*, 2017,8(5-6):566 - 576.
- [7] CAO Y, TAN S, TU Y, et al. MicroRNA-125a-5p inhibits invasion and metastasis of gastric cancer cells by targeting BRMS1 expression [J]. *Oncol Lett*, 2018,15(4):5119 - 5130.
- [8] YANG J, LI G, ZHANG K. MiR-125a regulates ovarian cancer proliferation and invasion by repressing GALNT14 expression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016,80:381 - 387.
- [9] ZHENG H, WU J, SHI J, et al. miR-125a-5p upregulation suppresses the proliferation and induces the cell apoptosis of lung adenocarcinoma by targeting NEDD9 [J]. *Oncol Rep*, 2017,38(3):1790 - 1796.
- [10] TONG Z, LIU N, LIN L, et al. miR-125a-5p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in colon cancer via targeting BCL2, BCL2L12 and MCL1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015,75:129 - 136.
- [11] LI N, LIU L. Mechanism of resveratrol in improving ovarian function in a rat model of premature ovarian insufficiency [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2018,25:228 - 250.
- [12] ZHAO Y, SUN H, FENG M, et al. Metformin is associated with reduced cell proliferation in human endometrial cancer by inhibiting PI3K/AKT/mTOR signaling [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018,34(5):428 - 432.
- [13] JONES NL, XIU J, CATTERJEE-PAER S, et al. Distinct molecular landscapes between endometrioid and non-endometrioid uterine carcinomas [J]. *Int J Cancer*, 2017,140(6):1396 - 1404.
- [14] TANG H, LI RP, LIANG P, et al. miR-125a inhibits the migration and invasion of liver cancer cells via suppression of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2015,10(2):681 - 686.
- [15] BU Q, YOU F, PAN G, et al. MiR-125b inhibits anaplastic thyroid cancer cell migration and invasion by targeting PIK3CD [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017,88(3):443 - 448.

(2018-09-03 收稿,2018-11-07 修回)  
中文编辑:刘平;英文编辑:冉海勇