

miR-203靶向调控CUL2对HPV16阳性宫颈癌细胞生物学特性的影响

李亚芹^{1,2}, 刘亚涛^{1,2}, 张宏蕾³, 赵卫红^{2*}

¹山西医科大学第二临床医学院妇产科, 山西太原 030001; ²山西医科大学第二医院妇产科, 山西太原 030001;

³山西医科大学基础医学院病理学与病理生理学系, 山西太原 030001

[中图分类号] R737.33

[文献标志码] A

[DOI]

10.11855/j.issn.0577-7402.2022.10.0968

[声明]

本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文]

李亚芹, 刘亚涛, 张宏蕾, 等. miR-203靶向调控CUL2对HPV16阳性宫颈癌细胞生物学特性的影响[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(10): 968-975.

[收稿日期] 2022-05-20

[录用日期] 2022-07-09

[上线日期] 2022-07-25

[摘要] 目的 探讨微小RNA 203-3p(miR-203)靶向调控枯灵素2(CUL2)对人乳头瘤病毒16型(HPV16)阳性宫颈癌细胞生物学特性的影响。方法 收集2018年9月—2019年9月于山西医科大学第二医院妇产科行宫颈癌筛查, HPV检测为单一HPV16阳性, 病理检查为宫颈鳞癌(SCC)的样本及相应癌旁组织(对照组)各10份。采用实时定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测SCC与相应癌旁组织, 以及人SCC细胞(SiHa)与人永生表皮细胞(HaCaT)中miR-203的表达。采用GO和KEGG富集法分析miR-203参与的功能和通路, TargetScan网站及双荧光素酶报告基因实验验证miR-203与CUL2的靶向调控作用。将miR-203模拟物或抑制剂转染至SiHa细胞, 建立过表达或低表达miR-203的细胞模型, 采用qRT-PCR和Western blotting检测CUL2 mRNA及蛋白的表达; 采用CCK-8法、划痕实验、Annexin V-APC/PI双染色法评估SiHa细胞的增殖、迁移和凋亡能力。结果 qRT-PCR检测分析结果显示, 与相应癌旁组织和HaCaT细胞相比, miR-203在SCC组织和SiHa细胞中的表达水平均明显降低($P<0.01$)。GO和KEGG富集结果显示, miR-203广泛参与泛素化过程并与恶性肿瘤参与的信号通路有关。TargetScan与双荧光素酶报告基因实验表明, miR-203与CUL2存在靶向调控关系($P<0.01$)。qRT-PCR及Western blotting结果表明, 过表达miR-203时, CUL2 mRNA及蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而低表达miR-203则可上调CUL2 mRNA及蛋白的表达($P<0.01$)。CCK-8、划痕实验和Annexin V-APC/PI双染结果显示, 过表达miR-203可降低SiHa细胞的增殖率和迁移率($P<0.01$), 升高细胞凋亡率($P<0.05$); 相反, 低表达miR-203可升高SiHa细胞的增殖率和迁移率($P<0.01$), 降低细胞凋亡率($P<0.01$)。结论 miR-203可能通过靶向CUL2抑制HPV16阳性宫颈癌细胞SiHa的生物学特性, 有望成为宫颈癌诊断和治疗的一个新的候选基因。

[关键词] 宫颈癌; 微小RNA 203-3p; 枯灵素2; 人乳头瘤病毒16型

Effects of miR-203 on the biological characteristics of HPV16-positive cervical cancer cells by targeted-regulating CUL2

Li Ya-Qin^{1,2}, Liu Ya-Tao^{1,2}, Zhang Hong-Lei³, Zhao Wei-Hong^{2*}

¹Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

²Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

³Department of Pathology and Pathophysiology, Basic Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

[基金项目] 国家自然科学基金(81702583); 山西省高等学校科技创新项目(201701D31111191); 山西省优秀青年基金项目(201901D211506); 山西省回国留学人员科研资助项目(2022-195)

[作者简介] 李亚芹, 硕士研究生, 主要从事妇科肿瘤发病机制方面的研究

[通信作者] 赵卫红, E-mail: sydeyzwh@sxmu.edu.cn

*Corresponding author, E-mail: sydeyzwh@sxmu.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81702583), the Science and Technology Innovation Project of Higher Education in Shanxi Province (201701D31111191), the Outstanding Youth Fund Project of Shanxi Province (201901D211506), and the Research Project Supported by Shanxi Scholarship Council of China (2022-195)

[Abstract] Objective To explore the effect of *hsa-microRNA-203-3p* (*miR-203*) targeted-regulating *Cullin2* (*CUL2*) on the biological characteristics of human papillomavirus 16 (HPV16) positive cervical cancer cells. **Methods** A total of 10 patients underwent cervical cancer screening from September 2018 to September 2019 in the Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Hospital of Shanxi Medical University. HPV genotyping was performed as single HPV16 positive, and pathological examination showed cervical squamous cell carcinoma (SCC). Ten corresponding paracancer normal tissue samples were collected as control group. Real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) was performed to detect the expression of *miR-203* in cervical squamous cell carcinoma and corresponding adjacent tissues, cervical cancer cell line (SiHa) and human immortal keratinocyte line (HaCaT) cells. GO and KEGG enrichment were applied to analyze the functions and pathways *miR-203* involved. The regulatory relationship between *miR-203* and *CUL2* were verified *via* TargetScan website and dual luciferase reporter assay. The *miR-203* mimics or inhibitor were transfected into SiHa cells to establish cell models of high and low expression of *miR-203*, and the expressions of *CUL2* mRNA and protein were detected by qRT-PCR and Western blotting. The proliferation, migration and apoptosis of SiHa cells were assessed by CCK-8, scratch assay and Annexin V-APC/PI double staining, respectively. **Results** Results of qRT-PCR indicated that, compared with the corresponding adjacent tissues and HaCaT cells, the relative expression level of *miR-203* decreased obviously in both cervical SCC tissues and SiHa cells ($P < 0.01$). The results of GO and KEGG enrichment methods showed that *miR-203* was widely involved in the ubiquitination process and the signaling pathways involved in the malignancies. TargetScan website and dual-luciferase reporter assay showed that the targeting regulatory relationship existed between *miR-203* and *CUL2* ($P < 0.01$). qRT-PCR and Western blotting indicated that overexpression of *miR-203* reduced the expressions of *CUL2* mRNA and protein ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); While low expression of *miR-203* up-regulated the expressions of *CUL2* mRNA and protein ($P < 0.01$). CCK-8, scratch experiments and Annexin V-APC/PI double staining method confirmed that overexpression of *miR-203* decreased proliferation rate and migration rate of SiHa cells ($P < 0.01$), and elevated cell apoptosis rate ($P < 0.05$). In contrast, low expression of *miR-203* increased the proliferation rate and migration rate of SiHa cells ($P < 0.01$), and reduced the apoptosis rate ($P < 0.01$). **Conclusion** The *miR-203* might suppress the biological characteristics of HPV16-positive cervical cancer cells SiHa by targeting *CUL2*, and it was expected to become a new candidate gene in diagnosis and treatment of cervical cancer.

[Key words] cervical cancer; *hsa-microRNA-203-3p*; *Cullin2*; human papillomavirus 16

宫颈癌是全球女性常见的第四大癌症，据报道，2020年全球新发宫颈癌病例约60.4万例，死亡约34.2万例^[1]。人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是宫颈癌的主要病原体，然而，近90%的HPV感染可在3年内自行消除，约10%可持续感染，仅1%发展成宫颈癌^[2-3]。鉴于HPV16型(HPV16)致癌性最强且最为常见^[4-6]，阐明HPV16阳性宫颈癌发生的分子机制将有助于开发新的治疗策略。微小RNA 203-3p(*hsa-microRNA-203-3p*, *miR-203*)是一种表皮特异性miRNA，与肿瘤发生密切相关。既往研究及本课题组前期研究发现，*miR-203*在HPV感染致宫颈癌的过程中发挥了抑癌作用^[7]。然而，关于*miR-203*参与宫颈癌发生的下游机制报道较少，仍有待深入研究。生物信息学预测及双荧光素酶报告基因实验显示，枯灵素2(*Cullin2*, *CUL2*)可能是*miR-203*的潜在靶基因，已被证实可调节泛素化、降解蛋白酶体，并参与包括细胞周期、基因转录和信号转导在内的各种细胞过程，在宫颈癌等恶性肿瘤的发展和预后中起关键作用^[8]。本研究探讨了*miR-203*是否通过调控*CUL2*表达进而影

响HPV16阳性宫颈癌细胞的生物学行为，旨在阐明*miR-203*在HPV16感染致宫颈癌中的作用机制，为阻断宫颈癌的发生提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床样本、细胞系及主要试剂、仪器 收集2018年9月—2019年9月山西医科大学第二医院妇产科10对HPV16阳性的宫颈鳞癌(squamous cervical carcinoma, SCC)样本及相应癌旁组织，立即用液氮冷冻，保存于-80℃备用。本研究获山西医科大学第二医院伦理委员会审批(2013-002)，所有患者均知情同意。人胚肾上皮细胞(293T)、人永生表皮细胞(HaCaT)和人SCC细胞(SiHa)均购自中国上海科学院细胞库。DMEM、胎牛血清(FBS)和Opti-MEM购自美国Hyclone公司，总RNA提取、FastStart Universal SYBR Green Master试剂盒和cDNA合成试剂盒购自日本TaKaRa公司，双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国Promega公司，细胞凋亡检测试剂盒购自中国南京Keygen公司，*miR-203*模拟物(*miR-203* mimics)及其阴性对照(*miR-203* mimics

NC)、*miR-203*抑制剂(*miR-203 inhibitor*)及其阴性对照(*miR-203 inhibitor NC*)均由中国上海吉玛制药技术有限公司合成(表1)。CCK-8试剂盒购自中国上海Dojindo实验室,脂质体3000转染试剂购自美国Invitrogen公司, β -actin抗体(#4967)购自美国CST公司,CUL2抗体(#sc-166506)购自美国Santa Cruz公司。倒置荧光显微镜购自德国Leica公司,酶标仪购自郑州安图生物工程股份有限公司,NovoCyte流式细胞仪购自美国ACEA公司。

表1 *miR-203*转染片段序列

Tab.1 *miR-203* sequence for transfection experiment

基因	序列
<i>miR-203 mimics</i>	正义: 5'-GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG-3' 反义: 5'-AGUGGGUCCUAAACAUUUCACUU-3'
<i>miR-203 mimics NC</i>	正义: 5'-UUCUCCGAAACGUGUCACGUTT-3' 反义: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAIT-3'
<i>miR-203 inhibitor</i>	5'-CUAGUGGUCCUAAACAUUUCAC-3'
<i>miR-203 inhibitor NC</i>	5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3'

1.2 细胞培养、细胞转染及分组 将SiHa和HaCaT细胞在含有1%青(链)霉素和10% FBS的DMEM中培养。根据实验说明书,将带有6-羧基荧光素(6-FAM)标记的*miR-203 mimics/inhibitor*及其相应的NC片段分别通过脂质体3000转染SiHa细胞。6 h

后,丢弃上清液,在黑暗环境中用PBS冲洗细胞。随后向细胞中加入含有10% FBS的DMEM,于荧光显微镜下拍摄图像以确认转染率。为构建过表达和低表达*miR-203*的细胞模型,将不作任何处理及转染后的SiHa细胞分为空白对照组、*miR-203 mimics*组、*miR-203 mimics NC*组、*miR-203 inhibitor*组和*miR-203 inhibitor NC*组。

1.3 生物信息学分析 应用基因本体论(GO)富集法和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集法分别观察*miR-203*参与的功能和通路。通过TargetScan公共数据库对*miR-203*的靶mRNAs进行预测。

1.4 双荧光素酶报告基因实验 设计CUL2野生型序列(CUL2 WT)与CUL2突变体序列(CUL2 MUT),将以上目的启动子片段分别与*miR-203 mimics*和*mimics NC*共同转染至293T细胞中。将293T细胞被动裂解,加入荧光素酶反应缓冲液及相应底物,利用双荧光素酶检测系统,在酶平板上检测荧光素酶活性,计算相对荧光强度。

1.5 实时定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR) 用Trizol试剂从宫颈标本或细胞系中提取总RNA,用DNA合成试剂盒合成cDNA后进行qRT-PCR。将U6和18S作为内参照,并用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理数据以计算相对表达量。所用引物序列见表2。

1.6 CCK-8法检测SiHa细胞增殖率 将SiHa细胞接

表2 qRT-PCR引物序列

Tab.2 Primer sequence of qRT-PCR

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>miR-203</i>	AACCTTGCTCGTGAATGTTTAG	TATGCTTGTCTCGTCTCTGTGTC
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT
CUL2	GGTTACAACATAACCAATGGCA	TGCTGTCCCTGAAGCTCTTTATA
18S	GGAGTATGGTTGCAAAGCTGA	ATCTGTCAATCCTGTCCGTGT

种于96孔板中培养24 h,分别于转染后0、24、48 h用PBS洗2次,加入100 μ l DMEM作为新的培养液。将CCK-8(10 μ l)加入培养板各孔中,37 $^{\circ}$ C培养2 h后,用酶标仪测各孔在450 nm处的吸光度值。

1.7 划痕实验检测SiHa细胞迁移率 将SiHa细胞接种于6孔平板中转染,待细胞孵育至近90%融合时,利用无菌吸管尖端在每个孔的板底部垂直绘制划痕,PBS洗涤细胞2次,分别孵育0、24、48 h,观察划痕迁移情况,并在显微镜下成像。使用ImageJ软件分析划痕区域。细胞迁移率(%)=[(0 h划痕面积-24 h或48 h划痕面积)/0 h划痕面积] \times 100%。

1.8 Annexin V-APC/PI双染法检测SiHa细胞凋亡率 转染48 h后,用预冷的PBS冲洗SiHa细胞悬液2次。每个细胞样品中加入200 μ l结合缓冲液,后加

入10 μ l Annexin V-APC和5 μ l碘化丙啶(PI)进行双重染色。避光孵育15 min后,流式细胞仪检测Annexin V-APC阳性细胞所占比例,即细胞凋亡率。

1.9 Western blotting检测CUL2蛋白的相对表达水平 从转染48 h后的SiHa细胞中提取总蛋白。用含1%苯甲基磺酰氟的RIPA裂解液在冰上裂解细胞,于4 $^{\circ}$ C条件下12 000 r/min离心15 min后收集上清液。蛋白质定量采用BCA法。以CUL2和 β -actin抗体为一抗行Western blotting分析。采用Image Lab软件测量条带的相对灰度值。

1.10 统计学处理 采用SPSS 26.0、GraphPad Prism 8.0(GraphPad, La Jolla, CA, USA)软件包进行数据处理和图表绘制。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本t检验;多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用

LSD-*t*检验；偏态分布的计量资料以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示，组间比较采用秩和检验。计数资料以例(%)表示，组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-203在宫颈癌中的表达情况 qRT-PCR检测结果显示，10例宫颈癌组织中的miR-203表达明显低于相应的癌旁组织(0.27 ± 0.05 vs. 1.00 ± 0.10 , $P < 0.01$)。此外，SiHa细胞miR-203的表达明显低于HaCaT细胞(0.30 ± 0.09 vs. 1.00 ± 0.19 , $P < 0.01$)。

2.2 miR-203的功能、通路富集及与CUL2的靶向调控关系 GO分析结果显示，miR-203广泛参与了泛素化过程，如泛素依赖的SMAD蛋白分解代谢、蛋白酶体介导的泛素依赖蛋白分解代谢和泛素蛋白转移酶活性的正向调节等过程(图1A)。KEGG分析结果显示，转化生长因子- β 信号通路、Wnt信号通路、焦点黏连信号通路等与恶性肿瘤密切相关的信号通路是miR-203高度富集的通路(图1B)。TargetScan数据库表明，miR-203与CUL2在198-204和176-182碱基上存在结合位点(图1C)。此外，双荧光素酶报告基因检测结果显示，miR-203 mimics与CUL2 WT转染后荧光素酶活性明显低于mimics NC(0.78 ± 0.02 vs. 1.00 ± 0.03 , $P < 0.01$)，但miR-203 mimics与CUL2 MUT转染后荧光素酶活性与mimics NC比较差异无统计学意义(1.01 ± 0.05 vs. 1.00 ± 0.04 , $P > 0.05$)(图1D)。

2.3 过表达和低表达miR-203对CUL2 mRNA及蛋白的影响 qRT-PCR检测结果显示，与HaCaT细胞相比，SiHa细胞中CUL2 mRNA的表达水平明显增高(5.08 ± 1.65 vs. 1.00 ± 0.33 , $P < 0.05$ ，图2A)。普通光学显微镜及倒置荧光显微镜观察到，SiHa细胞经miR-203 mimics、miR-203 mimics NC、miR-203 inhibitor和miR-203 inhibitor NC转染后，暗视野内可见绿色荧光颗粒，6-FAM标记的阳性细胞转染率达90%以上(图2B)。进一步进行qRT-PCR验证，结果显示，miR-203 mimics组miR-203表达水平与miR-203 mimics NC组比较明显升高(4.18 ± 0.03 vs. 0.97 ± 0.01 , $P < 0.01$)，而miR-203 inhibitor组miR-203表达水平与miR-203 inhibitor NC组比较明显降低(0.25 ± 0.05 vs. 0.97 ± 0.04 , $P < 0.05$)；miR-203 mimics组CUL2 mRNA的表达水平明显低于miR-203 mimics NC组(0.51 ± 0.02 vs. 1.10 ± 0.02 , $P < 0.05$)，而miR-203 inhibitor组CUL2 mRNA的表达水平明显高于miR-203 inhibitor NC组(3.93 ± 0.05 vs. 1.10 ± 0.02 , $P < 0.01$)(图2C)。Western blotting检测结果显示，与miR-203 mimics NC组比较，miR-203 mimics组CUL2

蛋白表达水平明显降低(0.32 ± 0.01 vs. 0.70 ± 0.01) ($P < 0.01$)；而与miR-203 inhibitor NC组比较，miR-203 inhibitor组CUL2蛋白表达水平明显升高(0.92 ± 0.02 vs. 0.60 ± 0.01 , $P < 0.01$)(图2D)。

2.4 过表达和低表达miR-203对SiHa细胞增殖、迁移和凋亡的影响 CCK-8法检测结果显示，与miR-203 mimics NC组比较，miR-203 mimics组SiHa细胞的增殖率明显降低($24.72\% \pm 0.87\%$ vs. $35.87\% \pm 1.72\%$, $P < 0.01$)；而与miR-203 inhibitor NC组比较，miR-203 inhibitor组SiHa细胞的增殖率明显增高($50.42\% \pm 0.70\%$ vs. $36.69\% \pm 1.43\%$, $P < 0.01$)(图3A)。划痕实验结果显示，miR-203 mimics组SiHa细胞迁移率较miR-203 mimics NC组明显降低($20.7\% \pm 0.76\%$ vs. $45.12\% \pm 0.23\%$, $P < 0.01$)；而miR-203 inhibitor组SiHa细胞迁移率较miR-203 inhibitor NC组明显升高($95.93\% \pm 0.31\%$ vs. $45.8\% \pm 0.24\%$, $P < 0.01$)(图3B)。Annexin V-APC/PI双染法检测结果显示，miR-203 mimics组SiHa细胞凋亡率较miR-203 mimics NC组明显增高($14.83\% \pm 1.59\%$ vs. $10.69\% \pm 0.20\%$, $P < 0.05$)；而miR-203 inhibitor组SiHa细胞凋亡细胞率较miR-203 inhibitor NC组明显降低($2.20\% \pm 0.40\%$ vs. $10.87\% \pm 1.37\%$, $P < 0.01$)(图3C)。

3 讨 论

miR-203是由Lena等^[9]发现的一种位于人类染色体(14q32-33)不稳定区域的上皮性miRNA。miR-203的表达在多种肿瘤组织(如前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌和非小细胞肺癌)中下调，可分别通过靶向调控ERK、Akt2、bcl-w、Twist1和RGS17来抑制肿瘤细胞生长，影响肿瘤细胞功能，进而发挥抑癌作用^[10-15]。可见，14q32-33杂合性缺失不仅影响胚胎中表皮的分化和保护性皮肤层的形成，而且可调节肿瘤生长过程，促进恶性肿瘤的发生。此外，Wilting等^[16]发现，miR-203基因异常可诱发HPV感染的宫颈癌，当外源性主动导入miR-203时，宫颈癌细胞则生长缓慢。本研究也发现，miR-203在HPV16阳性宫颈癌组织和SiHa细胞中的表达水平明显低于相应的癌旁组织和HaCaT细胞。这一初步发现与先前的研究结果一致，提示miR-203可能为一种肿瘤抑制miRNA，其异常表达在HPV16阳性宫颈癌的发生中起着极其重要的作用。

已知miR-203基因序列相对保守，目前仅少部分miR-203靶基因的生物学功能得到鉴定。如miR-203可通过调节BIRC5和ZEB1的表达分别影响UWB1.289和HeLa细胞^[17-18]。此外，miR-203被证明可靶向泛素化特异性多肽酶26(Usp26)，并影响食

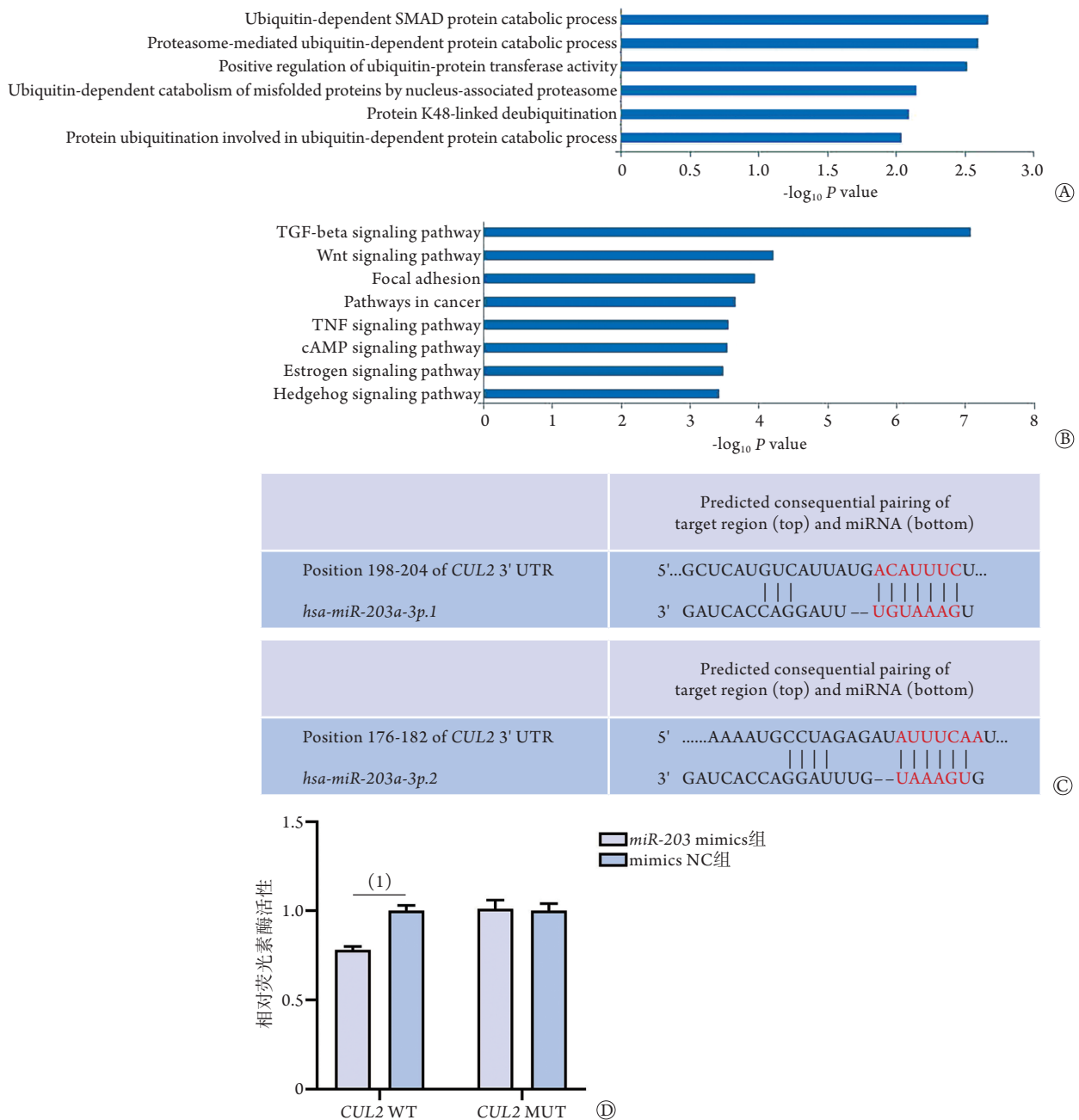


图1 miR-203的功能、通路富集及与CUL2的靶向关系

Fig.1 Function, pathway enrichment and targeting regulatory relationship with *CUL2* of miR-203

A. GO富集分析; B. KEGG富集分析; C. miR-203与CUL2的结合位点; D. miR-203与CUL2的靶向关系; (1) $P < 0.01$

管癌中SNAI1的表达,进而影响肿瘤细胞功能^[19]。然而,miR-203在宫颈癌中相应靶基因的具体调节机制仍不十分清楚。本研究通过GO和KEGG富集分析发现,miR-203广泛参与了泛素化修饰和恶性肿瘤的发生过程;通过TargetScan数据库预测miR-203的下游靶基因,初步将与泛素化过程密切相关的CUL2基因作为研究靶点;然后采用双荧光素酶报告基因实验证实miR-203与CUL2之间存在靶向调控关系,明确了CUL2为miR-203的一个直接靶点。

CUL2是枯灵素家族泛素连接酶的重要部分,广泛参与泛素化过程,可调节几乎所有的生命活

动,如细胞周期、增殖、凋亡、分化和转移等^[20]。Xu等^[21]检测了137份宫颈组织样本中CUL2、HPV16 E7 mRNA水平,发现CUL2、HPV16 E7的mRNA表达水平与宫颈病变进展呈明显正相关,其机制可能为HPV16感染后,E7癌蛋白可通过与CUL2结合形成泛素连接酶复合体,导致成视网膜母细胞瘤蛋白pRb的降解^[22-23]。以上研究结果提示CUL2与HPV16感染致宫颈癌的发生相关。本研究通过qRT-PCR检测了HaCaT细胞和SiHa细胞中CUL2 mRNA的表达后发现,SiHa细胞中CUL2 mRNA的表达水平高于HaCaT细胞。随后选取SiHa细胞,利用功能获得或

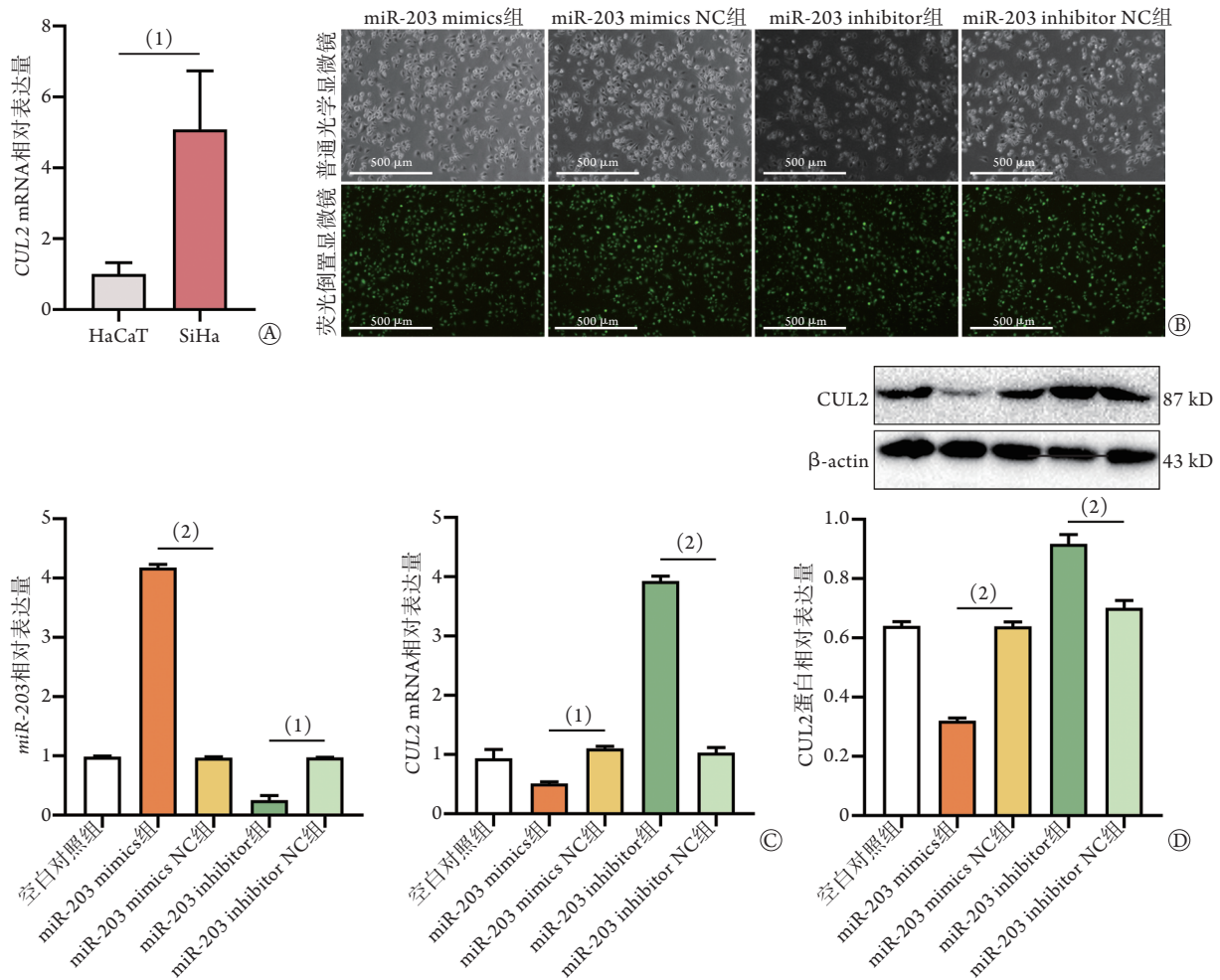


图2 过表达和低表达miR-203对CUL2 mRNA及蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of overexpression and low expression of miR-203 on CUL2 mRNA and protein

A. qRT-PCR检测HaCaT和SiHa细胞中CUL2 mRNA的表达情况; B. 过表达和低表达miR-203的SiHa细胞普通光学显微镜及倒置荧光显微镜成像结果; C. qRT-PCR检测过表达和低表达miR-203的SiHa细胞miR-203及CUL2 mRNA的相对表达水平; D. Western blotting检测过表达和低表达miR-203的SiHa细胞CUL2蛋白的相对表达水平; (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$

缺失的方法，构建过表达及低表达miR-203的细胞模型，以观察差异表达miR-203对其下游CUL2的效应及宫颈癌细胞生物学特性的变化，结果发现，miR-203过表达可下调CUL2 mRNA及蛋白的表达水平，抑制SiHa细胞的增殖、迁移，并促进其凋亡；而miR-203低表达则可使CUL2 mRNA及蛋白的表达水平升高，促进SiHa细胞的增殖及迁移，抑制其凋亡。

综上所述，本研究证实miR-203可直接负向调节CUL2的表达，进而抑制HPV16阳性宫颈癌细胞的增殖、迁移，并促进其凋亡，提示基于miR-203的CUL2靶向沉默可能为HPV16感染致宫颈癌发生的调控机制之一，对宫颈癌的早期诊断和晚期靶向治疗具有一定的指导意义。但本研究仅在细胞水平展开初步探讨，而miR-203在HPV16阳性宫颈癌中的具体作用机制仍有待通过动物实验进一步验证。未来有望将miR-203作为宫颈癌的一个潜在生物标

志物，为完善HPV16阳性宫颈癌的发病机制提供新思路。

【参考文献】

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Della Fera AN, Warburton A, Coursey TL, et al. Persistent human papillomavirus infection[J]. Viruses, 2021, 13(2): 321.
- [3] Zhao XY, Zhang M, Zhu ZH, et al. Effect and mechanism of 6-gingerol on invasion and migration of HPV-positive and negative cervical cancer cells[J]. Med J Chin PLA, 2020, 45(7): 691-696. [赵行宇, 张漠, 朱志华, 等. 6-姜烯酚对HPV阳性及阴性宫颈癌细胞侵袭及迁移的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(7): 691-696.]
- [4] Bhattacharjee R, Das SS, Biswal SS, et al. Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: molecular pathways and targeted therapeutic strategies[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2022, 174: 103675.

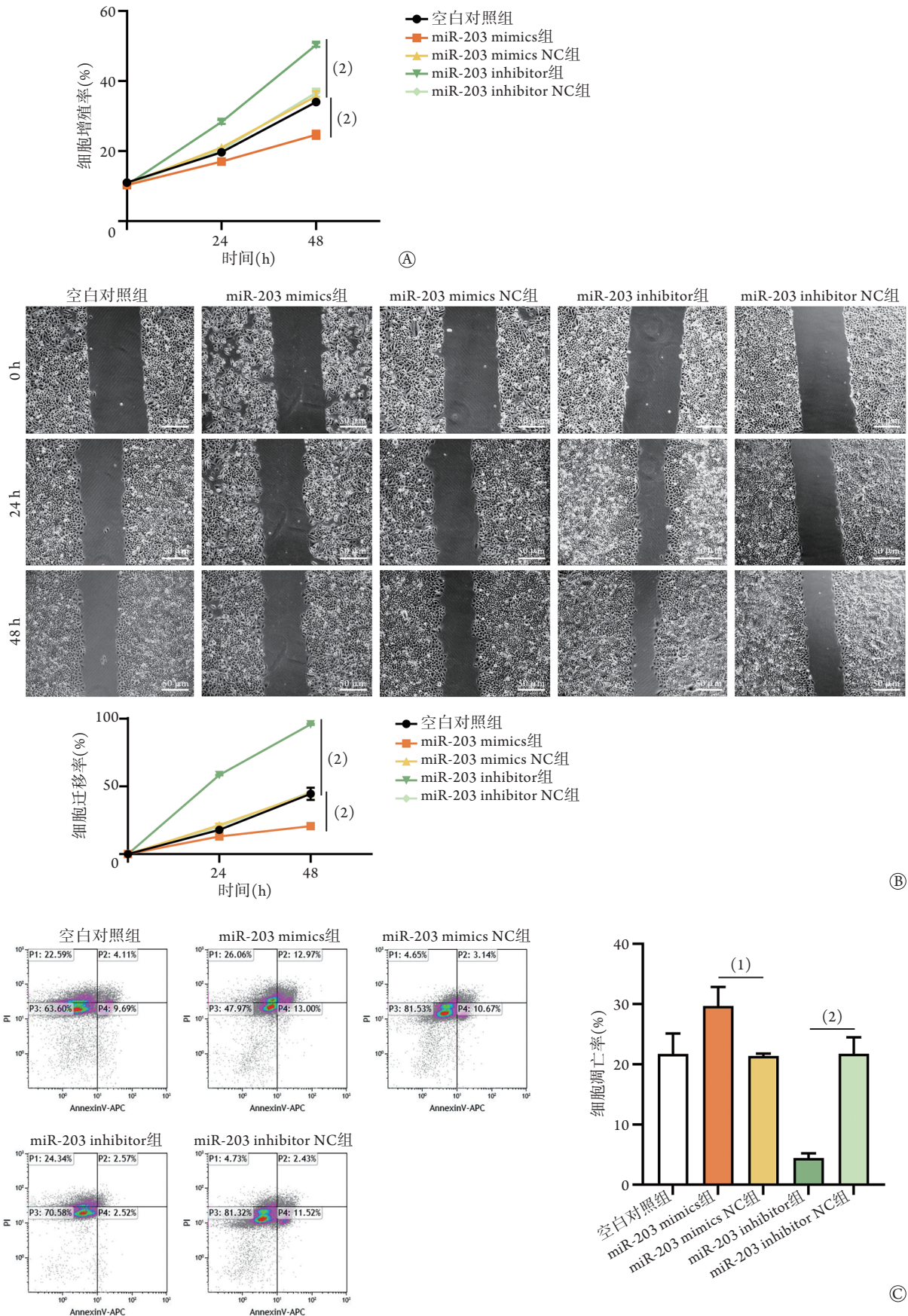


图3 过表达和低表达miR-203对SiHa细胞的增殖、迁移和凋亡的影响

Fig.3 Effect of overexpression and low expression of miR-203 on proliferation, migration and apoptosis of SiHa cells

A. CCK-8法检测细胞增殖率; B. 划痕实验测定细胞迁移率; C. 细胞凋亡实验检测细胞凋亡率; (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$

- [5] Khan A, Das BC, Abiha U, *et al.* Insights into the role of complement regulatory proteins in HPV mediated cervical carcinogenesis[J]. *Semin Cancer Biol*, 2021(6): S1044-579X(21)00161-9.
- [6] Ocadiz-Delgado R, Cruz-Colin JL, Alvarez-Rios E, *et al.* Expression of miR-34a and miR-15b during the progression of cervical cancer in a murine model expressing the HPV16 E7 oncoprotein[J]. *J Physiol Biochem*, 2021, 77(4): 547-555.
- [7] Hao M, Zhao WH, Zhang LL, *et al.* Low folate levels are associated with methylation-mediated transcriptional repression of miR-203 and miR-375 during cervical carcinogenesis[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(6): 3863-3869.
- [8] Scott DC, Rhee DY, Duda DM, *et al.* Two distinct types of E3 ligases work in unison to regulate substrate ubiquitylation[J]. *Cell*, 2016, 166(5): 1198-1214, e24.
- [9] Lena AM, Shalom-Feuerstein R, di Val Cervo PR, *et al.* miR-203 represses 'stemness' by repressing Δ Np63[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(7): 1187-1195.
- [10] Meng Y, Hu X, Li S, *et al.* miR-203 inhibits cell proliferation and ERK pathway in prostate cancer by targeting IRS-1[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 1028.
- [11] Wang SL, Dong XW, Zhao F, *et al.* MiR-203 inhibits cell proliferation, invasion, and migration of ovarian cancer through regulating RGS17[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2021, 35(3): 1109-1115.
- [12] Saini S, Arora S, Majid S, *et al.* Curcumin modulates microRNA-203-mediated regulation of the Src-Akt axis in bladder cancer[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011, 4(10): 1698-1709.
- [13] Bo JJ, Yang GL, Huo KL, *et al.* microRNA-203 suppresses bladder cancer development by repressing bcl-w expression[J]. *FEBS J*, 2011, 278(5): 786-792.
- [14] Shen J, Zhang JH, Xiao MH, *et al.* miR-203 suppresses bladder cancer cell growth and targets Twist1[J]. *Oncol Res*, 2018, 26(8): 1155-1165.
- [15] Wang S, Zhang C, Chen R. Circ_0006220 promotes non-small cell lung cancer progression *via* sponging miR-203-3p and regulating RGS17 expression[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2022, 41: 9603271211062854.
- [16] Wilting SM, Verlaat W, Jaspers A, *et al.* Methylation-mediated transcriptional repression of microRNAs during cervical carcinogenesis[J]. *Epigenetics*, 2013, 8(2): 220-228.
- [17] Zheng ZH, Wu DM, Fan SH, *et al.* LncRNA AB209371 up-regulated survivin gene by down-regulating miR-203 in ovarian carcinoma[J]. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1): 92.
- [18] Zhang W, Liu J, Wu Q, *et al.* HOTAIR contributes to stemness acquisition of cervical cancer through regulating miR-203 interaction with ZEB1 on epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Oncol*, 2021, 2021: 4190764.
- [19] Li G, Qi HW, Dong HG, *et al.* Targeting deubiquitinating enzyme USP26 by microRNA-203 regulates Snail1's pro-metastatic functions in esophageal cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 355.
- [20] Wang SW, Xia WJ, Qiu MT, *et al.* Atlas on substrate recognition subunits of CRL2 E3 ligases[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 46707-46716.
- [21] Xu JF, Fang YF, Wang XY, *et al.* CUL2 overexpression driven by CUL2/E2F1/miR-424 regulatory loop promotes HPV16 E7 induced cervical carcinogenesis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(21): 31520-31533.
- [22] Huh K, Zhou X, Hayakawa H, *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor[J]. *J Virol*, 2007, 81(18): 9737-9747.
- [23] Zhao WH, Liu YT, Zhang LL, *et al.* MicroRNA-154-5p regulates the HPV16 E7-pRb pathway in Cervical Carcinogenesis by targeting CUL2[J]. *J Cancer*, 2020, 11(18): 5379-5389.

(责任编辑: 张小利)