

孕激素诱导的 microRNA-152 对子宫内膜 上皮细胞增殖的抑制作用*

赵友波, 袁东智, 潘俊丽, 聂 莉, 张金虎, 何亚萍, 岳利民[△]

四川大学华西基础医学与法医学院 生理学教研室(成都 610041)

【摘要】 目的 研究孕激素诱导 microRNA-152 的表达及其对子宫内膜上皮细胞增殖的抑制作用。方法 培养子宫内膜上皮细胞 Ishikawa, 将其分为 4 组, 分别为空白对照组(control, C 组)、 10^{-8} mol/L 雌激素处理组(estrogen, E 组)、 10^{-6} mol/L 孕激素处理组(progesterone, P 组)以及相应浓度的雌、孕激素联合处理组(estrogen plus progesterone, E&P 组), 利用实时定量 PCR 检测 microRNA-152 的成熟体 microRNA-152-3p 的表达。将 microRNA-152-3p 拟似剂转染雌激素预处理的细胞, microRNA-152-3p 抑制剂转染雌、孕激素联合处理的细胞, CCK-8 法观察 microRNA-152-3p 对细胞增殖的影响。利用 microRNA 靶蛋白数据库预测 microRNA-152-3p 的靶蛋白, 并利用 Western blot 加以验证。结果 实时定量 PCR 结果显示 E 组与 C 组相比, 其细胞 microRNA-152-3p 的表达量无明显变化($P>0.05$); P 组细胞 microRNA-152-3p 的表达量相比 C 组增加($P<0.05$); 且 E&P 组的 microRNA-152-3p 表达量高于 C 组和 P 组(P 均 <0.05)。对 microRNA-152-3p 靶蛋白的预测表明 CDC14A 是其一个重要的靶蛋白。转染 microRNA-152-3p 拟似剂能够抑制雌激素对子宫内膜上皮细胞的增殖效应($P<0.05$), 同时下调 CDC14A 蛋白的表达($P<0.05$)。而 microRNA-152-3p 抑制剂能一定程度解除孕激素对子宫内膜上皮细胞的增殖抑制效应($P<0.05$), 同时上调 CDC14A 蛋白水平($P<0.05$)。结论 孕激素可通过诱导 microRNA-152-3p 的表达抑制子宫内膜上皮细胞的增殖, CDC14A 蛋白可能是 microRNA-152-3p 抑制子宫内膜上皮细胞增殖的靶蛋白。

【关键词】 孕激素 microRNA-152 子宫内膜上皮细胞 CDC14A

Effect of Progesterone-induced MicroRNA-152 on the Proliferation of Endometrial Epithelial Cells ZHAO You-bo, YUAN Dong-zhi, PAN Jun-li, NIE Li, ZHANG Jin-hu, HE Ya-ping, YUE Li-min[△]. Department of Physiology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: yuelimin@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To determine the expression of microRNA-152 induced by progesterone and its effect on the proliferation of endometrial epithelial cells (EECs). **Methods** Cultured EECs, Ishikawa were divided into four groups: control group (C group), 10^{-8} mol/L estrogen treated group (E group), 10^{-6} mol/L progesterone group (P group) and estrogen plus progesterone treated group (E&P group). The expression of mature microRNA-152 (microRNA-152-3p) of was detected by qRT-PCR. The estrogen treated cells were transfected with mimic-microRNA-152-3p. The estrogen and progesterone treated cells were transfected with inhibitor-microRNA-152-3p. Cell proliferations were detected by CCK-8 assay. The target gene of microRNA-152-3p proteins was predicted using microRNA target databases and validated by Western blot. **Results** qRT-PCR showed no difference between C and E groups ($P>0.05$) in the expression of microRNA-152-3p. P group had higher expressions of microRNA-152-3p than C group ($P<0.05$). E&P group had higher expressions of microRNA-152-3p than C group and P group. MicroRNA target protein prediction suggested that CDC14A is one of direct target proteins of microRNA-152-3p. The results of CCK-8 assay showed that mimic-microRNA-152-3p transfection blocked proliferations of estrogen treated cells and lowered expressions of CDC14A in these cells; while inhibitor-microRNA-152-3p promotes proliferations of estrogen and progesterone treated cells and increased expressions of CDC14A in these cells. **Conclusion** Progesterone may suppress proliferations of EECs through inducing expressions of microRNA-152-3p. CDC14A is probably one target protein of microRNA-152-3p for its action on EECs.

【Key words】 Progesterone microRNA-152 Endometrial epithelial cells (EECs) CDC14A

子宫的结构和功能受到雌激素和孕激素的双重调控, 雌激素促进子宫内膜上皮细胞增殖, 孕激素可拮抗雌激素对子宫内膜上皮细胞的增殖效应, 并促

* 国家自然科学基金(No. 31271251)资助

[△] 通讯作者, E-mail: yuelimin@scu.edu.cn

使其分化为具有分泌功能的组织,以保证胚胎在宫腔内的正常发育和顺利着床。如孕激素作用不足,可能导致内膜增生过长,甚至内膜癌的发生^[1],然而孕激素调控内膜细胞增殖的分子机制尚未得到充分阐明。

孕激素产生生物学效应的主要途径是进入细胞,与胞内的孕激素受体(progesterone receptor, PR)结合形成“激素-受体复合物”,然后进入细胞核调节某些特定基因的转录,产生相应的功能蛋白,进而影响细胞的生命活动^[1, 2]。但近年来的研究显示孕激素对基因表达的调控作用也可能发生在基因转录后的水平^[3]。microRNA 是一类长度为 22~25 个核苷酸的单链非编码 RNA,在转录后水平调节特定基因表达。越来越多的研究揭示了这类小 RNA 在细胞的增殖、分化、肿瘤形成等生理和病理过程中均起着重要作用^[3-5]。本实验室前期工作利用高通量测序技术对子宫内膜上皮细胞中的 microRNA 表达谱进行分析,初步筛选出孕激素诱导表达的 microRNA^[3],生物信息学分析推测部分 microRNA 可能参与了细胞增殖的调控,microRNA-152 是其中之一,其主要发挥生物学功能的是成熟体 microRNA-152-3p,本研究拟首先验证子宫内膜上皮细胞 Ishikawa 中 microRNA-152-3p 表达的孕激素依赖性,并探讨 microRNA-152-3p 对预测的靶基因产物 CDC14A 蛋白的表达的影响及其对 Ishikawa 细胞增殖的抑制作用。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

本实验采用体外培养的子宫内膜上皮细胞株, Ishikawa 细胞(ATCC-LGC Standards GmbH, Wesel, Germany)。

1.2 主要试剂

雌激素(β -estradiol, E2758)和孕激素(progesterone, P0130)购于 Sigma 公司,microRNA-152-3p 拟似剂、microRNA-152-3p 拮抗剂和 microRNA-152-3p 的检测引物 Bulge-LoopTM miRNAqRT-PCR Primer 由 Ribobio 生物公司设计合成,cDNA 逆转录试剂盒购于 Invitrogen 公司,SYBR Green 实时定量 PCR mix 购于 Bio-Rad 公司,CCK-8 试剂盒购于碧云天生物公司,CDC14A 抗体购于 Abcam 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 用含有 5% 胎牛血清(经活性炭

处理以去除原有的激素成分)和 100 U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM/F12 无酚红培养液,在 37 $^{\circ}$ C、CO₂ 浓度为 5% 的环境培养细胞。将细胞接种在 6 孔板内,待细胞生长融合度达到 80% 时进行分组实验。

1.3.2 实验设计及分组 用于检测 microRNA-152-3p 表达的细胞,分为 4 个实验组:分别是空白对照组(control, C 组),仅给予溶剂处理细胞;单独孕激素组(progesterone, P 组),仅给予溶剂处理 48 h 后,再以 10^{-6} mol/L 孕激素单独处理细胞 24 h;单独雌激素组(estrogen, E 组),以 10^{-8} mol/L 雌激素预处理 48 h,再给予溶剂处理 24 h;雌孕激素联合处理组(estrogen & progesterone, E&P 组),以 10^{-8} mol/L 雌激素预处理 48 h,再以 10^{-6} mol/L 孕激素处理 24 h。雌、孕激素用培养基稀释(下同),本实验重复 3 次。

用于研究 microRNA-152-3p 对子宫内膜细胞增殖及 CDC14A 蛋白表达的影响,首先用终浓度为 10^{-8} mol/L 雌激素预处理细胞 48 h 后分为 4 组;1、2 组分别用终浓度为 100 nmol/L 的非特异性拟似剂对照和特异 microRNA-152-3p 拟似剂处理 24 h;3、4 组均用终浓度 10^{-6} mol/L 孕激素处理后同时分别加入终浓度 200 nmol/L 的非特异性抑制剂对照和特异 microRNA-152-3p 抑制剂,24 h 后^[3]收集细胞进行细胞增殖活性检测和 microRNA-152-3p 靶蛋白检测。本实验重复 3 次。

1.3.3 实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 microRNA-152-3p 表达 在末次给药 24 h 后分别收集各组细胞,用 D-Hanks' 缓冲液清洗 3 次。每孔细胞中加入适量的 Trizol 试剂处理后,提取细胞中的 RNA,取 1 μ L 的 5 μ mol/L 逆转录引物贮存液,加 79 μ L 去离子水,配置成 62.5 nmol/L 的逆转录引物工作液。按照逆转录试剂盒说明书构建反应体系将上述步骤中提取的 RNA 逆转录成 cDNA,并采用聚合酶链式反应扩增,检测各组细胞间 microRNA 表达的差异。逆转录反应条件:42 $^{\circ}$ C 反应 60 min,70 $^{\circ}$ C 反应 10 min,反应结束后,迅速转移至冰上冷却。实时定量反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 20 s,95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 20 s,70 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,共 40 个循环。分析方法采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

1.3.4 细胞增殖检测 在末次给药 24 h 后分别收集各组细胞,在 96 孔板的待检细胞加入 CCK-8 (20 μ L/孔),37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1~2 h,在酶联免疫检测仪 450 nm 波长检测各孔光密度值(OD 值),OD

值可反映细胞增殖程度,每组实验设置 6 个重复孔。

1.3.5 microRNA-152-3p 靶蛋白预测 利用 Targetscan、Pictar、miRDB、RNA22-HAS、DIANA-MICROT microRNA 靶蛋白数据库对 microRNA-152-3p 靶蛋白进行分析。最终选择以上 5 个数据库所得信息互相吻合的预测结果进行 Western blot 验证。

1.3.6 Western blot 检测 microRNA-152-3p 靶蛋白表达 在末次给药 24 h 后收集待检细胞,RIPA 裂解法提取蛋白,BCA 法定量蛋白,按照常规流程进行实验:上样、电泳、转膜、封闭、CDC14A 一抗孵育(购自 abcam,抗体浓度 1 : 1 000)、二抗(山羊抗兔)孵育(抗体浓度 1 : 20 000)、BeyoECL Plus 显影曝光;内参采用 β -actin 蛋白,使用方法同 CDC-14A。以上实验重复 3 次,并进行灰度值分析,以各蛋白条带灰度值与内参蛋白的灰度值比值为目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

按照配对设计原则进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 孕激素诱导子宫内膜上皮细胞中 microRNA-152-3p 表达

qRT-PCR 检测 microRNA-152-3p 表达,多次重复检测均发现 E 组的表达量最低,遂设 E 组表达量为 1.00,计算其他组的相对表达量。结果显示与 C 组(1.15)相比,E 组的 microRNA-152-3p 表达量(1.00)没有明显变化($P > 0.05$),P 组的 microRNA-152-3p 表达量有一定的增加(1.75 vs.

1.15, $P < 0.05$),差异有统计学意义;而 E & P 组表达量高于 C 组(3.85 vs. 1.15, $P < 0.05$),差异有统计学意义,并且也高于 P 组(3.85 vs 1.75, $P < 0.05$),差异有统计学意义。以上结果说明孕激素能够诱导 Ishikawa 细胞 microRNA-152-3p 的表达。

2.2 孕激素诱导的 microRNA-152-3p 抑制子宫内膜上皮细胞增殖

细胞增殖检测结果显示(图 1),用特异性 microRNA-152-3p 拟似剂(2 组)作用于雌激素预处理的子宫内膜上皮细胞 24 h,其细胞增殖活性与非特异性的拟似剂对照组(1 组)相比降低($P < 0.05$)。用特异性 microRNA-152-3p 抑制剂(4 组)作用于雌、孕激素联合处理后的子宫内膜上皮细胞,其细胞增殖活性与非特异性的抑制剂对照组(3 组)相比,有明显增强($P < 0.05$)。以上结果提示孕激素诱导的 microRNA-152-3p 对子宫内膜上皮细胞的增殖具有抑制作用。

2.3 microRNA-152-3p 的重要靶蛋白 CDC14A 的检测

5 个数据库对 microRNA-152-3p 靶蛋白的预测表明 CDC14A 是其重要的一个靶蛋白,microRNA-152-3p 与 CDC14A 的预测结合位点如图 2A 所示。Western blot 检测结果显示用 microRNA-152-3p 拟似剂作用于雌激素预处理的 Ishikawa 细胞,CDC14A 蛋白的表达水平下降($P < 0.05$),而用 microRNA-152-3p 抑制剂作用雌、孕激素联合处理的 Ishikawa 细胞,其 CDC14A 蛋白表达水平有所上升($P < 0.05$)(图 2B),该结果提示孕激素诱导的 microRNA-152-3p 通过下调 CDC14A 影响 Ishikawa 细胞增殖。

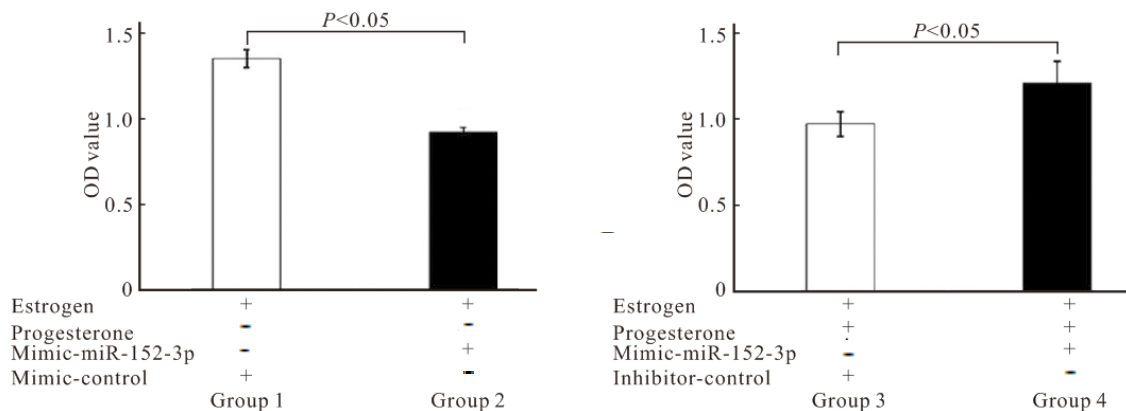


图 1 microRNA-152-3p 对 Ishikawa 细胞增殖的影响

Fig 1 Effects of microRNA-152-3p on proliferations of Ishikawa cells

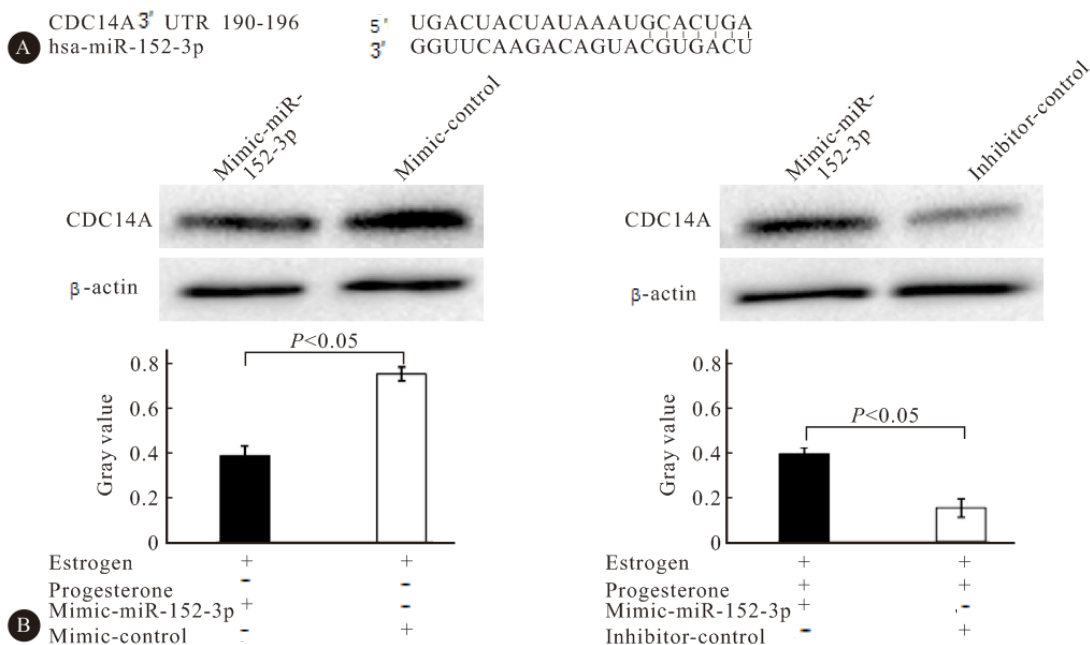


图 2 Ishikawa 细胞中 microRNA-152-3p 靶蛋白的预测和鉴定

Fig 2 Prediction and validation of microRNA target protein

A: The binding sites between microRNA-152-3p and CDC14A; B: CDC14A protein detected by Western blot

3 讨论

在正常生理状态下,子宫内膜上皮在卵巢分泌的雌、孕激素的作用下呈现周期性增殖、分化的特点。细胞的增殖、分化与细胞周期进程直接相关。孕激素对雌激素促子宫内膜上皮细胞增殖的拮抗作用可通过抑制对细胞周期进程有促进作用的正调控因子的表达实现^[1, 6]。根据分子生物学的基本原理,孕激素对特定基因表达的调控除在转录前的环节外,也可能发生在基因转录后的水平。

microRNA 是一类非编码的小片段 RNA 分子,它可特异性识别靶基因 mRNA 的 3' 端非转译序列(3' UTR),使 mRNA 发生降解或者抑制其翻译,导致靶基因转录后沉默。大量的研究,尤其是对肿瘤细胞中的大量研究显示,microRNA 也广泛参与了细胞周期进程的调控。近年来也有研究报道,与雌、孕激素作用失调有关的子宫内膜异位症、子宫内膜过度增生和内膜癌的病变组织中均存在 microRNA 表达谱的异常^[7-11],提示雌、孕激素也可通过调控 microRNA 的表达而发挥生理作用。我们在雌、孕激素诱导 microRNA-152-3p 表达的实验中发现单独雌激素处理的细胞 microRNA-152-3p 表达没有变化,而孕激素处理的子宫内膜上皮细胞其 microRNA-152-3p 高于空白对照组,而雌、孕

激素联合处理的细胞其 microRNA-152-3p 表达不仅高于空白对照,且高于单独孕激素处理细胞的表达水平,这一结果充分证明了子宫内膜上皮细胞中 microRNA-152-3p 表达具有孕激素依赖。雌、孕激素联合处理的子宫内膜上皮细胞 microRNA-152-3p 表达高于单独孕激素处理的细胞这一看似矛盾的结果,其实进一步证明了雌、孕激素之间既互为拮抗但又彼此协同的基础理论。雌激素的作用是孕激素作用的基础,雌激素可增加子宫内膜上皮细胞孕激素受体的表达,为孕激素的后续作用奠定基础,因而在本实验中雌、孕激素联合处理对 microRNA-152-3p 表达的促进作用高于单独孕激素的作用。

细胞增殖实验分别用 microRNA-152-3p 拟似剂作用于单独雌激素预处理的 Ishikawa 细胞引起细胞增殖的抑制,用 microRNA-152-3p 特异性抑制剂处理雌、孕激素联合处理的子宫内膜上皮细胞则促进细胞增殖,这些结果提示 microRNA-152-3p 对细胞增殖具有抑制作用。另据已有研究报道,microRNA-152 对子宫内膜癌细胞增殖具有抑制作用,子宫内膜癌与正常子宫内膜组织的 microRNA 表达谱有较大差异,其中 microRNA-152 在子宫内膜癌中低表达;低分化子宫内膜癌细胞 HEC-1-A 尽管对孕激素反应性低,但转染 microRNA-152 后可以抑制该细胞增殖^[12]。我们对子宫内膜上皮细

细胞的研究结果与已有的对子宫内膜病理组织的研究结果互相印证,提示孕激素诱导特定 microRNA 表达是其发挥对子宫内膜上皮细胞增殖抑制作用的一个重要机制。

microRNA 对细胞功能活动的影响往往是通过在转录后水平下调某些特定的功能蛋白,即靶蛋白的表达实现的。我们通过对 5 个数据库所得 microRNA-152-3p 靶蛋白的预测信息比对发现 CDC14A 是其重要的靶蛋白之一。CDC14 是一个双磷酸酶蛋白磷酸酶,已有对酵母及人骨肉瘤细胞研究显示,CDC14 是一个重要的细胞周期进程调控因子^[13],CDC14 表达的缺失不仅会抑制 DNA 合成^[14],还会导致细胞分裂受阻^[15]。在本实验中,我们发现当给予 microRNA-152-3p 拟似剂作用于雌激素预处理的 Ishikawa 细胞,CDC14A 蛋白的表达水平下降,同时细胞增殖也受到抑制;而用特异性 microRNA-152-3p 抑制剂作用雌、孕激素联合预处理的子宫内膜上皮细胞,CDC14A 表达增加,而细胞增殖活性提高,进一步证明了孕激素诱导的 microRNA-152-3p 可通过下调 CDC14A 蛋白的表达,拮抗雌激素的作用,抑制子宫内膜上皮细胞的增殖。

本研究首次揭示孕激素通过诱导特定 microRNA 的表达而下调对细胞增殖有促进作用的靶蛋白表达进而抑制子宫内膜上皮细胞增殖是孕激素拮抗雌激素作用的重要分子机制之一。该结果也可作为子宫内膜癌的诊断和治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- 1 Diep CH, Daniel AR, Mauro LJ, *et al.* Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *J Mol Endocrinol*, 2015; 54(2):R31-R53.
- 2 Wilkens J, Critchley H. Progesterone receptor modulators in gynaecological practice. *J Fam Plann Reprod Health Care*, 2010; p36(2):87-92.
- 3 Yuan DZ, Yu LL, Qu T, *et al.* Identification and characterization of progesterone- and estrogen-regulated microRNAs in mouse endometrial epithelial cells. *Reprod Sci*,

2015;22(2):223-234.

- 4 Suryawanshi S, Vlad AM, Lin HM, *et al.* Plasma microRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 2013; 19(5):1213-1224.
- 5 Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update*, 2010; 16(2):142-165.
- 6 Mesiano S, Wang Y, Norwitz ER. Progesterone receptors in the human pregnancy uterus. *Reprod Sci*, 2011; 18(1):6-19.
- 7 Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T, *et al.* The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *Mol Hum Reprod*, 2007; 13(11):797-806.
- 8 Marsh EE, Lin Z, Yin P, *et al.* Differential expression of microRNA species in human uterine leiomyoma versus normal myometrium. *Fertil Steril*, 2008; 89(6):1771-1776.
- 9 Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem*, 2010; 148(4):381-392.
- 10 Cohn DE, Fabbri M, Valeri N, *et al.* Comprehensive miRNA profiling of surgically staged endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 2010; 202(6):656. e1-e8. doi:10.1016/j.ajog.2010.02.051.
- 11 Burney RO, Hamilton AE, Aghajanova L, *et al.* MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Mol Hum Reprod*, 2009; 15(10):625-631.
- 12 Tsuruta T, Kozaki K, Uesugi A, *et al.* miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Res*, 2011; 71(20):6450-6462.
- 13 Vazquez-Novelle MD, Mailand N, Ovejero S, *et al.* Human Cdc14A phosphatase modulates the G2/M transition through Cdc25A and Cdc25B. *J Biol Chem*, 2010; 285(52):40544-40553.
- 14 Dulev S, de Renty C, Mehta R, *et al.* Essential global role of CDC14 in DNA synthesis revealed by chromosome under replication unrecognized by checkpoints in cdc14 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009; 106(34):14466-14471.
- 15 Kao L, Wang YT, Chen YC, *et al.* Global analysis of cdc14 dephosphorylation sites reveals essential regulatory role in mitosis and cytokinesis. *Mol Cell Proteomics*, 2014; 13(2):594-605.

(2015-04-18 收稿, 2015-09-20 修回)

编辑 吕 熙