

DOI: 10.3969/j.issn.1673-713X.2019.04.007

# miR-199a-5p 下调 NF- $\kappa$ B 信号通路 激活水平抑制宫颈癌细胞恶性生物学行为

张明川, 张玲, 马一鸣, 程淑霞, 王莉

## 【摘要】

**目的** 探讨 miR-199a-5p 对宫颈癌细胞生长、侵袭和迁移的影响和机制。

**方法** Real-time PCR 测定 miR-199a-5p 在宫颈癌 HeLa、HCC94、CaSki 细胞和正常宫颈 Ect1/E6E7 细胞中的表达差异。在宫颈癌细胞中转染 miR-199a-5p mimics, real-time PCR 检测过表达效果, MTT 检测增殖, 克隆形成实验测定克隆形成能力, Transwell 小室测定侵袭和迁移能力, Western blot 检测细胞中 p-p65、p-I $\kappa$ B 蛋白表达变化。使用核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 激活剂 PMA 处理转染 miR-199a-5p mimics 后的宫颈癌细胞, 同样使用上述方法测定细胞生长、克隆、侵袭和迁移能力变化。

**结果** miR-199a-5p 在宫颈癌 HeLa、HCC94、CaSki 细胞中的表达水平低于正常宫颈 Ect1/E6E7 细胞。miR-199a-5p mimics 提高宫颈癌细胞中 miR-199a-5p 表达水平, 降低细胞增殖、克隆、侵袭和迁移能力, 减少细胞中 p-p65、p-I $\kappa$ B 蛋白表达。NF- $\kappa$ B 激活剂 PMA 可以逆转 miR-199a-5p 对宫颈癌细胞增殖、克隆、侵袭和迁移能力的抑制作用。

**结论** miR-199a-5p 通过下调 NF- $\kappa$ B 信号通路激活水平抑制宫颈癌细胞生长、侵袭和迁移。

**【关键词】** 宫颈肿瘤; 肿瘤浸润; 细胞增殖; NF- $\kappa$ B; miR-199a-5p

www.cmbp.net.cn

中国医药生物技术, 2019, 14(4):329-334

宫颈癌是世界上常见的女性恶性肿瘤, 宫颈癌细胞恶性增殖和转移是患者死亡的关键。目前对于肿瘤的分子机制研究发现, miRNA 在肿瘤细胞恶性行为中具有关键作用<sup>[1-2]</sup>。miR-199a-5p 在肿瘤组织中异常表达, 并且参与肿瘤的侵袭转移以及增殖等过程, 目前已知其在结直肠癌、卵巢癌、肝癌中表达下降, 并且具有负调控肿瘤细胞恶性增殖的作用<sup>[3-5]</sup>。核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路是一个在肿瘤组织中过度激活的肿瘤调控因子, 其激活后可以增加肿瘤的恶性程度<sup>[6]</sup>。之前的研究报道显示, miR-199a-5p 可以降低卵巢癌细胞中 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活水平, miR-199a-5p

表达下调后可以通过 NF- $\kappa$ B 信号通路诱导膀胱癌的发生<sup>[7]</sup>。有研究显示, miR-199a-5p 在宫颈癌组织中低表达<sup>[8]</sup>。目前对于 miR-199a-5p 在宫颈癌细胞生长、侵袭和迁移中的作用及调控机制是否与 NF- $\kappa$ B 相关尚不清楚。本研究通过体外细胞实验探讨 miR-199a-5p 在宫颈癌细胞恶性生物学行为中的作用, 为靶向基因治疗宫颈癌提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

宫颈癌 HeLa、HCC94、CaSki 细胞和正常宫颈 Ect1/E6E7 细胞购自上海歌凡生物细胞库; miRNA 第一链合成试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司; 实时荧光定量 PCR 试剂购自宝生物工程(大连)有限公司; p-p65 抗体、p-I $\kappa$ B 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; Trizol 试剂和转染试剂 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司; NF- $\kappa$ B 激活剂 PMA 购自美国 Sigma 公司; miR-199a-5p mimics、mimics control 购自上海吉玛制药技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 Real-time PCR 检测 miR-199a-5p 在宫颈癌细胞中的表达变化** 分别在宫颈癌 HeLa、HCC94、CaSki 细胞和正常宫颈 Ect1/E6E7 细胞中添加 300  $\mu$ l 的 Trizol 试剂, 充分裂解后, 常规方法提取细胞中总 RNA。吸取 1  $\mu$ l 的 RNA, 测定其 260 nm 和 280 nm 下的光密度 (OD), OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值应在 1.8~2.0 之间, 表明 RNA 纯度较好, 符合实验要求。以总 RNA 作为模板, 根据 miRNA 第一链合成试剂盒进行反转录, 合成的 cDNA 保存在 -20  $^{\circ}$ C。以 real-time PCR 检测 miR-199a-5p 表达变化。PCR 体系为: 10 nmol/L 的

作者单位: 450000 郑州大学附属肿瘤医院妇科 (张明川、马一鸣、程淑霞、王莉); 839000 新疆, 哈密市第二人民医院肿瘤外科 (张玲)  
通信作者: 王莉, Email: 13837196622@163.com  
收稿日期: 2019-03-27

上下游引物各 1  $\mu$ l、cDNA 模板 1  $\mu$ l、SYBR Premix EX Taq 10  $\mu$ l, 添加 7  $\mu$ l 的 DEPC 水。PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 60  $^{\circ}$ C 退火 40 s; 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 一共循环 45 次。以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值表示 miR-199a-5p 表达水平。内参为 U6。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, miR-199a-5p 上游 5' GGGCCCAGTGTTCAGACTAC 3', 下游 5' GTGCAGGGTCCGAGGT 3'; U6 上游 5' CGCTTCGGCAGCACA 3', 下游 5' AACGCTTCACGAATTTGCGT 3'。

**1.2.2 细胞分组** 取 HeLa 细胞, 用转染试剂 Lipofectamine2000 将 miR-199a-5p mimics、mimics control 转染到细胞中, 按照转染试剂标准流程操作。把转染后的 HeLa 细胞分别记为 miR-199a-5p、miR-NC, 把只加入转染试剂的 HeLa 细胞记为对照。细胞在培养 2 d 以后, 使用 real-time PCR 检测细胞中 miR-199a-5p 表达变化, 评估过表达效果。

**1.2.3 CCK8 测定细胞增殖** 在 96 孔细胞培养板中接种 miR-NC、miR-199a-5p 细胞, 每个孔内加入  $5 \times 10^3$  个细胞 (细胞悬浮液体积为 100  $\mu$ l)。细胞培养 2 d 以后, 在每个孔内添加 CCK8 工作液各 10  $\mu$ l, 放在 37  $^{\circ}$ C 孵育反应 3 h 以后, 测定每个孔 450 nm 的 OD 值, 使用不含细胞的孔调零。

**1.2.4 克隆形成实验测定细胞克隆** 在 6 孔细胞培养板中接种 miR-NC、miR-199a-5p 细胞, 每个孔中添加  $1 \times 10^3$  个细胞, 每隔 2 天换液一次, 培养 12 d 以后, 用 PBS 溶液将细胞洗涤, 结晶紫染色后, 计数克隆形成数目, 计算细胞克隆形成率。克隆形成率 (%) = (克隆形成数目  $\div$  接种细胞数目)  $\times$  100%

**1.2.5 Transwell 小室测定细胞侵袭和迁移** 细胞迁移和侵袭实验均用 Transwell 小室进行检测, 侵袭实验前需要用基质胶将小室湿化, 用不含血清的细胞培养液将 miR-NC、miR-199a-5p 细胞悬浮, 在小室的上室中添加 200  $\mu$ l 的细胞悬浮液, 在小室的下室中添加 500  $\mu$ l 的含血清培养液, 放在培养箱中培养 2 d。取出小室, 用棉签把没有穿膜的细胞擦掉, 使用 0.1% 的结晶紫染色后, 在显微镜下观察, 随机选择 5 个视野, 计算细胞穿膜数目。

**1.2.6 Western blot 检测 p-p65、p-I $\kappa$ B 蛋白表达** 取培养 2 d 后的 miR-NC、miR-199a-5p 细胞, 添加含有抑蛋白酶分解试剂的 RIPA 裂解溶

液, 混合均匀以后, 放在冰上裂解 20 min。4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清溶液, 蛋白存在于上清中。将蛋白同  $5 \times$  上样缓冲液混匀, 置于 100  $^{\circ}$ C 孵育 5 min。将蛋白添加到 SDS-PAGE 凝胶上样孔中, 初始电压设置为 80 V, 分离胶中的电压为 100 V。以恒定电流 300 mA 转膜 70 min。取出电转后的 PVDF 膜, 置于 5% 牛血清白蛋白中封闭, 然后将 PVDF 膜放在已经稀释好的一抗孵育液中, 放在室温中反应 2 h。将 PVDF 膜放在 1:3000 稀释后的二抗反应液中, 置于室温中孵育 2 h。采用 ECL 法显色以后, 用 Image J 分析条带的灰度值, 把 GAPDH 作为内参, 分析目的蛋白表达水平。p-p65、p-I $\kappa$ B 抗体以 1:400 稀释。

**1.2.7 PMA 对过表达 miR-199a-5p 的宫颈癌细胞增殖、克隆、侵袭和迁移影响** 取转染 miR-199a-5p mimics 后的 HeLa 细胞, 用含有 0、100 nmol/L 的 NF- $\kappa$ B 激活剂 PMA 细胞培养液培养, 记为 miR-199a-5p、miR-199a-5p + PMA。培养 2 d 后, 按照 MTT、克隆形成实验、Transwell 小室方法检测细胞增殖、克隆、侵袭和迁移变化。

### 1.3 统计学处理

用 SPSS21.0 软件分析统计实验数据, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组数据用独立样本  $t$  检验, 多组差异比较用单因素方差, 组间比较用 LSD- $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-199a-5p 在宫颈癌细胞中低表达

miR-199a-5p 在宫颈癌 HeLa、HCC94、CaSki 细胞中的表达水平均低于正常宫颈 Ect1/E6E7 细胞 ( $P < 0.05$ )。HeLa 细胞中 miR-199a-5p 表达水平低于 HCC94、CaSki 细胞 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。

### 2.2 miR-199a-5p mimics 提高宫颈癌 HeLa 细胞中 miR-199a-5p 表达水平

宫颈癌 HeLa 细胞中转染 miR-199a-5p mimics, 细胞中的 miR-199a-5p 水平升高, 见图 2。miR-199a-5p mimics 提高宫颈癌 HeLa 细胞中 miR-199a-5p 表达水平。

### 2.3 miR-199a-5p 抑制宫颈癌细胞增殖、克隆、侵袭、迁移

过表达 miR-199a-5p 的宫颈癌 HeLa 细胞 OD 值和克隆形成率降低, 细胞侵袭和迁移数目下降 (表 1)。miR-199a-5p 具有抵抗宫颈癌 HeLa 细胞增殖、克隆、侵袭和迁移的作用。

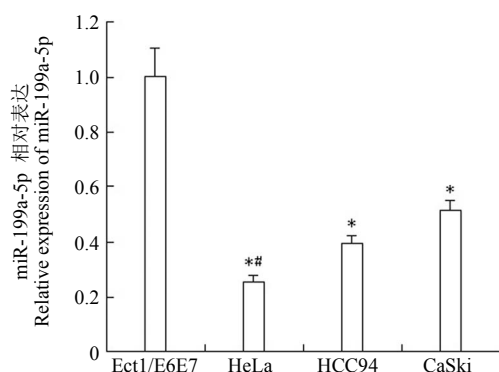


图 1 宫颈癌 HeLa、HCC94、CaSki 细胞和正常宫颈 Ect1/E6E7 细胞中 miR-199a-5p 表达水平 (\*与 Ect1/E6E7 比较,  $P < 0.05$ ; #与 HCC94、CaSki 比较,  $P < 0.05$ )

**Figure 1** Expression of miR-199a-5p in HeLa, HCC94, CaSki cells and normal cervical Ect1/E6E7 cells (\*Compared with Ect1/E6E7,  $P < 0.05$ ; #Compared with HCC94 and CaSki,  $P < 0.05$ )

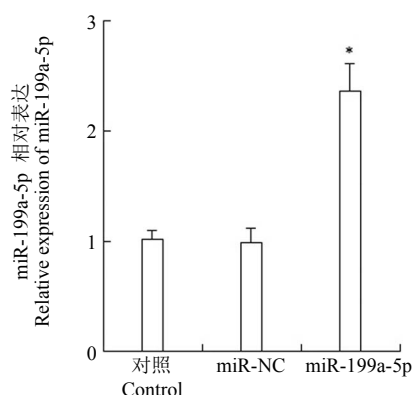


图 2 miR-199a-5p mimics 转染前后宫颈癌 HeLa 细胞中 miR-199a-5p 表达水平 (\*与 miR-NC 比较,  $P < 0.05$ )

**Figure 2** Expression of miR-199a-5p in HeLa cells of cervical cancer before and after miR-199a-5p mimics transfection (\*Compared with miR-NC,  $P < 0.05$ )

表 1 miR-199a-5p mimics 转染前后宫颈癌 HeLa 细胞 OD 值、克隆形成率、侵袭数目和迁移数目 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 1** OD value, cloning rate, number of invasion and migration of HeLa cells before and after miR-199a-5p mimics transfection ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Groups	OD 值	OD value	克隆形成率 (%)	Cloning rate (%)	侵袭数目	Number of invasion	迁移数目	Number of migration
对照	Control	$0.45 \pm 0.06$		$48.62 \pm 5.32$		$87.14 \pm 9.62$		$115.35 \pm 10.57$	
miR-NC		$0.47 \pm 0.05$		$49.17 \pm 6.74$		$84.17 \pm 8.54$		$116.84 \pm 11.72$	
miR-199a-5p		$0.32 \pm 0.03^*$		$35.10 \pm 3.25^*$		$50.23 \pm 3.29^*$		$73.45 \pm 8.65^*$	
<i>F</i>		8.529		6.781		21.467		16.859	
<i>P</i>		0.018		0.029		0.002		0.003	

注: \*与 miR-NC 比较,  $P < 0.05$ 。

Note: \*Compared with miR-NC,  $P < 0.05$ .

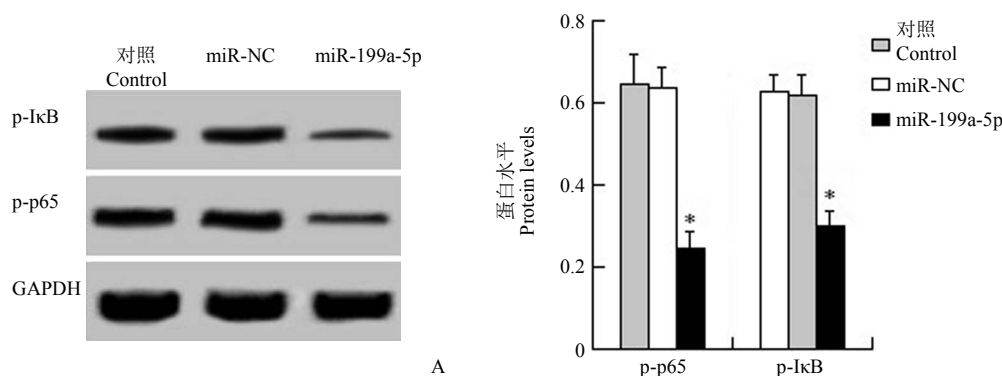


图 3 miR-199a-5p mimics 转染前后宫颈癌 HeLa 细胞中 p-p65、p-IkB 蛋白水平 (A: Western blot 检测 miR-199a-5p mimics 转染前后宫颈癌 HeLa 细胞中 p-p65、p-IkB 蛋白水平; B: 以 GAPDH 为内参, 分析 p-p65、p-IkB 蛋白水平; \*与 miR-NC 比较,  $P < 0.05$ )

**Figure 3** p-p65 and p-IkB protein levels in HeLa cells before and after miR-199a-5p mimics transfection (A: Western blot was used to detect the levels of p-p65 and p-IkB protein in HeLa cells before and after miR-199a-5p mimics transfection; B: Using GAPDH as internal reference, the levels of p-p65 and p-IkB protein were analyzed; \*Compared with miR-NC,  $P < 0.05$ )

2.4 过表达 miR-199a-5p 降低宫颈癌细胞中 NF-κB 信号通路激活水平

过表达 miR-199a-5p 的宫颈癌 HeLa 细胞中 p-p65、p-IκB 蛋白水平降低（图 3）。表明 miR-199a-5p 具有抵抗宫颈癌 HeLa 细胞中 NF-κB 信号通路激活的作用。

2.5 NF-κB 信号通路激活剂 PMA 逆转作用

NF-κB 信号通路激活剂 PMA 处理转染 miR-199a-5p mimics 后的宫颈癌 HeLa 细胞，细胞中的 p-p65、p-IκB 蛋白水平升高，细胞 OD 值、克隆形成率、侵袭数目和迁移数目也升高。NF-κB 信号通路激活剂 PMA 可以提高过表达 miR-199a-5p 的宫颈癌 HeLa 细胞增殖、克隆、侵袭和迁移能力，见图 4 和表 2。

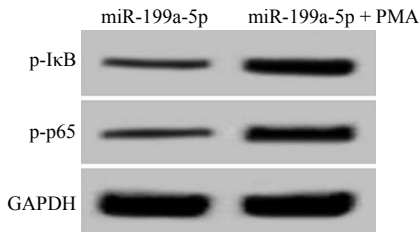


图 4 Western blot 检测 NF-κB 信号通路激活剂 PMA 对转染 miR-199a-5p mimics 后的宫颈癌 HeLa 细胞中 p-p65、p-IκB 蛋白影响

Figure 4 Western blot was used to detect the effects of PMA, an activator of NF-κB signaling pathway, on p-p65 and p-IκB proteins in cervical cancer HeLa cells transfected with miR-199a-5p mimics

3 讨论

miRNA 是一类具有复杂生物学作用的小分子 RNA，在生命机体分化、生长、凋亡等过程中具有多重作用<sup>[9]</sup>。miR-199a-5p 参与肿瘤进展过程，在肿瘤恶性发生和转移中具有重要作用<sup>[10]</sup>。目前对于 miR-199a-5p 的研究显示，miR-199a-5p 在肾细胞癌中表达缺失，上调 miR-199a-5p 后的肿瘤细胞生长能力降低，肿瘤形成能力减弱，miR-199a-5p 被看作是抑制肾癌进展的重要调控因子<sup>[11]</sup>。在肝癌中发现 miR-199a-5p 表达下调与肝癌患者的病理分期等有关，miR-199a-5p 能够降低肝癌细胞恶性增殖能力<sup>[5]</sup>。在结直肠癌等肿瘤中同样发现 miR-199a-5p 具有类似抑癌基因的作用<sup>[12]</sup>。我们的实验在宫颈癌细胞中发现 miR-199a-5p 低表达，并且过表达 miR-199a-5p 后的宫颈癌细胞增殖、克隆、侵袭和迁移能力下降，miR-199a-5p 在宫颈癌进展中可能发挥抑制作用，重建 miR-199a-5p 表达可能是治疗宫颈癌的途径。

实验还进一步探讨了 miR-199a-5p 的作用机制，在宫颈癌细胞中发现，过表达 miR-199a-5p 后的宫颈癌细胞中 p-p65、p-IκB 蛋白水平降低。p-p65、p-IκB 是 NF-κB 信号通路的调节因子，NF-κB 是存在于细胞内的核转录调节因子，其由于能够同 B 细胞的免疫球蛋白中的 κB 序列特异性的结合而被命名，NF-κB 能够调控细胞内很多基因表达，参与炎症、免疫反应、肿瘤进展、细胞发育、病毒复制等过程<sup>[13-15]</sup>。p65 是 NF-κB 的重要亚单位，其磷酸化后可以促进 NF-κB 信号激活<sup>[16]</sup>。IκB 是 NF-κB 信号激活过程中正调控因子，其被磷酸化后促进 NF-κB 信号激活<sup>[17]</sup>。实验提示

表 2 NF-κB 信号通路激活剂 PMA 处理 miR-199a-5p mimics 转染后宫颈癌 HeLa 细胞中 p-p65、p-IκB 蛋白水平及细胞 OD 值、克隆形成率、侵袭数目和迁移数目 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The levels of p-p65, p-IκB protein and cell OD value, cloning rate, number of invasion and number of migration in cervical cancer HeLa cells transfected with miR-199a-5p mimics treated by PMA, an activator of NF-κB signaling pathway ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	p-p65	p-IκB	OD 值 OD value	克隆形成率 (%) Cloning rate (%)	侵袭数目 Number of invasion	迁移数目 Number of migration
miR-199a-5p	0.26 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.04	34.17 ± 3.24	49.62 ± 6.32	72.10 ± 6.38
miR-199a-5p + PMA	0.68 ± 0.07*	0.67 ± 0.09*	0.40 ± 0.03*	42.32 ± 2.19*	77.35 ± 6.17*	99.51 ± 10.20*
t	9.552	6.938	3.464	3.610	5.438	3.946
P	0.001	0.002	0.026	0.023	0.006	0.017

注：\*与 miR-199a-5p 比较， $P < 0.05$ 。  
Note: \*Compared with miR-199a-5p,  $P < 0.05$ .

miR-199a-5p 作用机制可能与抑制 NF- $\kappa$ B 信号激活有关。

目前对于 NF- $\kappa$ B 在肿瘤中的研究显示, NF- $\kappa$ B 过度激活是诱导肿瘤恶性发展的重要环节<sup>[18-19]</sup>。我们的实验证实 NF- $\kappa$ B 激活剂可以逆转 miR-199a-5p 的抗宫颈癌细胞恶性生物学行为的作用,这与上述 NF- $\kappa$ B 在肿瘤中的作用相符合,同时也证明 miR-199a-5p 作用机制与负调控 NF- $\kappa$ B 有关。现阶段对于 miR-199a-5p 的作用机制研究发现,其可以调节膀胱癌细胞中 NF- $\kappa$ B 信号转导,miR-199a-5p 降低细胞中 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,下调 p65 的磷酸化水平<sup>[7]</sup>。本实验结果同上述研究结果一致,在宫颈癌细胞中证实了 miR-199a-5p 作用机制与 NF- $\kappa$ B 有关。

综上,miR-199a-5p 可能是宫颈癌恶性进展的抑制因子,提高宫颈癌中 miR-199a-5p 表达水平可能是治疗宫颈癌的途径,并且其作用机制与降低 NF- $\kappa$ B 信号激活水平有关。目前我们的实验只在一株宫颈癌细胞中进行了初步探讨,后续会在多株宫颈癌细胞及体内进行验证。本次实验结果为研究 miR-199a-5p 在宫颈癌中的作用和机制提供了参考,对于其具体的靶向调控作用位点还需进一步探索。

#### 参考文献

- [1] Flanagan MB. Primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening in the United States: is it time? Arch Pathol Lab Med, 2018, 142(6):688-692.
- [2] Li WT, Zheng H, Nguyen V, et al. Functional genomics profiling of bladder urothelial carcinoma microRNAome as a potential biomarker 1. Neoplasia, 2018, 20(4):364-373.
- [3] Zhu QD, Zhou QQ, Dong L, et al. MiR-199a-5p inhibits the growth and metastasis of colorectal cancer cells by targeting ROCK1. Technol Cancer Res Treat, 2018, 17(1):1-10.
- [4] Peng L, Ye P, Chen GQ, et al. Changes and significance expression of miR-199a-5p in primary and metastatic epithelial ovarian cancer of stage II-III. Shandong Med J, 2017, 57(35):39-41. (in Chinese)  
彭靓, 叶萍, 陈国庆, 等. II~III 期上皮性卵巢癌原发灶及转移灶中 miR-199a-5p 表达变化及其意义. 山东医药, 2017, 57(35):39-41.
- [5] Li B, He L, Zuo D, et al. Mutual regulation of miR-199a-5p and HIF-1 $\alpha$  modulates the Warburg effect in hepatocellular carcinoma. J Cancer, 2017, 8(6):940-949.
- [6] Chiang CF, Chao TT, Su YF, et al. Metformin-treated cancer cells modulate macrophage polarization through AMPK-NF- $\kappa$ B signaling. Oncotarget, 2017, 8(13):20706-20718.
- [7] Song T, Zhang X, Yang G, et al. Decrement of miR-199a-5p contributes to the tumorigenesis of bladder urothelial carcinoma by regulating MLK3/NF- $\kappa$ B pathway. Am J Transl Res, 2015, 7(12):2786-2794.
- [8] Zou RM, Hu Z, Chen H, et al. Clinical significance of miR-199a expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. J Medi Res, 2011, 40(7):55-59. (in Chinese)  
邹阮敏, 胡芝, 陈昊, 等. miR-199a 在宫颈癌及宫颈上皮内瘤样病变中的表达及意义. 医学研究杂志, 2011, 40(7):55-59.
- [9] Liu YJ, Li W, Chang F, et al. MicroRNA-505 is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation, migration and invasion. Oncol Rep, 2018, 39(2):491-500.
- [10] Huang GH, Shan H, Li D, et al. MiR-199a-5p suppresses tumorigenesis by targeting clathrin heavy chain in hepatocellular carcinoma. Cell Biochem Funct, 2017, 35(2):98-104.
- [11] Fang HY, Chen JG. Effect of miR-199a on the biological characteristics of renal cell carcinoma. J Pract Med Tech, 2016, 23(6):596-598. (in Chinese)  
方慧云, 陈敬国. miR-199a 对肾癌细胞系生物学性状的影响. 实用医技杂志, 2016, 23(6):596-598.
- [12] Matà R, Palladino C, Nicolosi ML, et al. IGF-I induces upregulation of DDR1 collagen receptor in breast cancer cells by suppressing MIR-199a-5p through the PI3K/AKT pathway. Oncotarget, 2016, 7(7):7683-7700.
- [13] Lou H, Li ZJ. Research progress of NF- $\kappa$ B in the field of ophthalmology. Int Eye Sci, 2017, 17(2):266-269. (in Chinese)  
楼红, 李志坚. NF- $\kappa$ B 在眼科领域的研究进展. 国际眼科杂志, 2017, 17(2):266-269.
- [14] Long L, Pang XX, Lei F, et al. SLC52A3 expression is activated by NF- $\kappa$ B p65/Rel-B and serves as a prognostic biomarker in esophageal cancer. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(14):2643-2661.
- [15] Xiong S, Wang Y, Li H, et al. Low dose of bisphenol A activates NF- $\kappa$ B/IL-6 signals to increase malignancy of neuroblastoma cells. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(6):1095-1103.
- [16] Velaie K, Samadi N, Soltani S, et al. NF $\kappa$ Bp65 transcription factor modulates resistance to doxorubicin through ABC transporters in breast cancer. Breast Cancer, 2017, 24(4):552-561.
- [17] Yang L, Song Z, Wang X, et al. Huaier extract enhances the treatment efficacy of paclitaxel in breast cancer cells via the NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  pathway. Oncol Rep, 2017, 38(6):3455-3464.
- [18] Sheng YH, He Y, Hasnain SZ, et al. MUC13 protects colorectal cancer cells from death by activating the NF- $\kappa$ B pathway and is a potential therapeutic target. Oncogene, 2017, 36(5):700-713.
- [19] Yang H, Huang S, Wei Y, et al. Curcumin enhances the anticancer effect of 5-fluorouracil against gastric cancer through down-regulation of COX-2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways. J Cancer, 2017, 8(18):3697-3706.

## miR-199a-5p down-regulates the activation level of NF- $\kappa$ B signaling pathway and inhibits malignant biological behavior of cervical cancer cells

ZHANG Ming-chuan, ZHANG Ling, MA Yi-ming, CHENG Shu-xia, WANG Li

### 【Abstract】

**Objective** To investigate the effects and mechanisms of miR-199a-5p on the growth, invasion and migration of cervical cancer cells.

**Methods** Real-time PCR was used to detect the expression of miR-199a-5p in HeLa, HCC94, CaSki cells and normal cervical Ect1/E6E7 cells. miR-199a-5p mimics were transfected into cervical cancer cells. Real-time PCR was used to detect the overexpression effect. MTT assay was used to detect proliferation and the colony formation ability was determined by clone formation test. Transwell chamber was used to measure invasion and migration ability. Western blot was used to detect the expression of p-p65 and p-I $\kappa$ B protein. The cervical cancer cells transfected with miR-199a-5p mimics were treated with PMA, an activator of NF- $\kappa$ B. The changes of cell growth, colony formation, invasion and migration ability were also measured by the above methods.

**Results** The expression level of miR-199a-5p in HeLa, HCC94 and CaSki cells was lower than that in normal cervical Ect1/E6E7 cells. miR-199a-5p mimics increased the expression of miR-199a-5p in cervical cancer cells and reduced cell proliferation, colony formation, invasion and migration, and the expression of p-p65 and p-I $\kappa$ B protein in cells. PMA, an activator of NF- $\kappa$ B, could reverse the inhibitory effect of miR-199a-5p on proliferation, colony formation, invasion and migration of cervical cancer cells.

**Conclusion** miR-199a-5p down-regulates the activation level of NF- $\kappa$ B signaling pathway and inhibits the growth, invasion and migration of cervical cancer cells.

**【Key words】** Uterine cervical neoplasms; Neoplasm invasiveness; Cell proliferation; NF-kappa B; miR-199a-5p

**Author Affiliations:** Department of Gynecologic Oncology, Cancer Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Henan 450000, China (ZHANG Ming-chuan, MA Yi-ming, CHENG Shu-xia, WANG Li); Department of Surgical Oncology, The Second People's Hospital of Hami, Xinjiang 839000, China (ZHANG Ling)

**Corresponding Author:** WANG Li, Email: 13837196622@163.com