

# lncRNA HNF1A-AS1 通过 miR-320d/SOX4 轴调节宫颈癌的发展

谢锦霞<sup>1</sup>, 刘晶晶<sup>2\*</sup>

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(项目编号: 2019 SF-210)

作者单位: 710100 陕西 西安, 西安市第四医院, 1. 生殖科; 2. 妇产科

作者简介: 谢锦霞, 毕业于天津医科大学, 硕士研究生, 主治医师, 主要研究方向为子宫疾病、不孕症的诊治

\* 通信作者, E-mail: huwt19860620@163.com

**【摘要】目的** 探讨长链非编码 RNA HNF1A-AS1(long noncoding RNA HNF1A-AS1, lncRNA HNF1A-AS1) 对宫颈癌细胞增殖、凋亡和上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响及机制研究。**方法** 采用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)检测微小 RNA 320d(microRNA-320d, miR-320d)在人宫颈癌细胞 C33A 和人宫颈上皮永生细胞株 H8 细胞中的表达水平, 分别用四甲基偶氮唑蓝(methylthiazolyl-tetrazolium, MTT)比色法、流式细胞仪和 Western blot 检测 miR-320d 对 C33A 细胞增殖、凋亡和 EMT 的影响。采用 miRanda 和双荧光素酶报告基因实验分析 miR-320d 与 HNF1A-AS1 作用的靶点, 检测 HNF1A-AS1 通过 miR-320d 对 C33A 细胞增殖、凋亡与 EMT 的影响。通过 TargetScan 和双荧光素酶报告基因实验分析 miR-320d 与 SOX4 之间的关系, 检测 SOX4 对 C33A 细胞增殖、凋亡和 EMT 的影响, 采用 RT-qPCR 和 Western blot 分析 HNF1A-AS1 及 miR-320d 对 SOX4 表达的影响。**结果** 在 C33A 细胞中, miR-320d 表达明显降低, HNF1A-AS1 和 SOX4 表达明显升高, 上调 miR-320d 抑制 C33A 细胞的增殖和 EMT, 促进癌细胞凋亡。HNF1A-AS1 3'UTR 靶向 miR-320d, 敲低 HNF1A-AS1 抑制了 C33A 细胞增殖和 EMT, 促进癌细胞凋亡。下调 HNF1A-AS1 和 miR-320d 表达能部分逆转 miR-320d 下调对 C33A 细胞增殖、凋亡和 EMT 的影响。miR-320d 和 SOX4 具有靶向作用, 敲低 SOX4 抑制了 C33A 细胞增殖和 EMT, 促进了癌细胞凋亡。下调 HNF1A-AS1 使 SOX4 表达量下降, miR-320d 表达量升高, 而且 HNF1A-AS1 能够通过 miR-320d 调控 SOX4 的表达。**结论** lncRNA HNF1A-AS1 通过 miR-320d/SOX4 轴调节宫颈癌的发展。

**【关键词】** HNF1A-AS1; miR-320d; SOX4; 宫颈癌; 增殖; EMT

**【中图分类号】** R 737.33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-4020(2021)06-045-06

doi: 10.3969/j.issn.1674-4020.2021.06.11

## LncRNA HNF1A-AS1 regulates the development of cervical cancer through miR-320d/SOX4 axis

XIE Jinxia<sup>1</sup>, LIU Jingjing<sup>2\*</sup>

1. Department of Reproductive Medicine; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Xi'an Fourth Hospital, Xi'an Shaanxi 710100, P. R. China

\* Corresponding author, E-mail: huwt19860620@163.com

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of lncRNA HNF1A-AS1 on proliferation, apoptosis and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cervical cancer cells and the underlying mechanism. **Methods** RT-qPCR was used to detect the expression of miR-320d in C33A and H8 cells. The effects of miR-320d on the proliferation, apoptosis of C33A cells and EMT were analyzed by MTT experiments, flow cytometry and Western blot experiments respectively. The miRanda and Dual luciferase reporter gene assay were used to analyze the correlation between HNF1A-AS1 and miR-320d. The effects of HNF1A-AS1 on the proliferation, apoptosis and EMT of

C33A cells through miR-320d were analyzed. The TargetScan and Dual luciferase reporter gene assay were used to analyze the correlation between miR-320d and SOX4. The effects of SOX4 on the proliferation, apoptosis of C33A cells and EMT were analyzed. The effects of HNF1A-AS1 and miR-320d on SOX4 expression were analyzed by RT-qPCR and Western blot. **Results** In C33A cells, the expression of miR-320d was significantly decreased, and the expressions of HNF1A-AS1 and SOX4 were significantly increased. Upregulation of miR-320d inhibited the proliferation of C33A cells and EMT and promoted the apoptosis of cancer cells. HNF1A-AS1 3'UTR targeted miR-320d. The down-regulation of HNF1A-AS1 inhibited the proliferation of C33A cells and EMT and promoted the apoptosis of cancer cells. The down-regulation of the HNF1A-AS1 and miR-320d can partially reverse the effects of miR-320d down-regulation on the proliferation, apoptosis of C33A cells and EMT. SOX4 3'UTR targeted miR-320d. The down-regulation of SOX4 inhibited C33A cells proliferation, EMT and promoted cells apoptosis. The down-regulation of the HNF1A-AS1 decreased the expression of SOX4 and increased the expression of miR-320d, and HNF1A-AS1 can regulate the expression of SOX4 through miR-320d. **Conclusion** LncRNA HNF1A-AS1 regulates the development of cervical cancer through miR-320d /SOX4 axis.

**[Key words]** HNF1A-AS1; miR-320d; SOX4; cervical cancer; proliferation; EMT

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,早期症状不明显,晚期出现阴道出血等症状<sup>[1]</sup>。近些年,宫颈细胞学筛查的普遍应用使宫颈癌的发病率和死亡率已有明显下降,但癌细胞生物学特性多种多样,导致宫颈癌易发生转移,并对治疗产生不同的反应。因此进一步了解宫颈癌的发展机制能为早期诊断和晚期预后提供新的分子理论基础。长链非编码RNA(long noncoding, lncRNA)是一类非编码RNA,含有200个核苷酸,翻译潜力有限<sup>[2-3]</sup>,研究发现lncRNAs参与细胞内外的多种活动,包括基因转录、mRNA剪接和肿瘤发生等<sup>[4-6]</sup>。HNF1A AS1是一种新鉴定的lncRNA,自鉴定以来,HNF1A AS1已被证明在人类肿瘤发生中起关键作用,如在口腔鳞癌和胶质瘤细胞中,HNF1A AS1表达上调,促进癌细胞的存活和转移,提示HNF1A AS1可能作为癌基因促进癌症发展<sup>[7-8]</sup>。然而,HNF1A AS1是否对宫颈癌细胞具有强大的促癌作用还没有深入的研究。本研究拟探究HNF1A AS1在宫颈癌发展过程中的作用及机制,为治疗宫颈癌患者提供新的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

人宫颈癌细胞C33A和人宫颈上皮永生化细胞株H8细胞来自上海生物细胞研究所;DMEM(Dulbecco's-modified Eagle's medium)培养基和胎牛血清来自美国Gibco公司;CCK-8试剂盒、点突变试剂盒和双荧光素酶活性检测试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)、Lipofectamine™ 2000购于美国Invitrogen公司;钙粘附蛋白E(epithelial-cadherin, E-cadherin)、钙粘附蛋白N(N-cadherin)、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关蛋白X(Bcl-2-Associated X, Bax)和GAPDH多克隆抗体购于上海圣克鲁斯生物科技有限公司;模拟物对照(mimics NC)、miR-320d模拟物(miR-320d mimics)、抑制剂对照(inhibitor NC)、miR-320d抑制剂(miR-320d inhibitor)、干扰对照(siRNA

NC)、HNF1A-AS1干扰(HNF1A-AS1 siRNA)、SOX4干扰(SOX4 siRNA)质粒由广州锐博生物科技有限公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养C33A细胞和H8细胞,于37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度条件下培养。

1.2.2 细胞转染 取生长状态良好的细胞,当细胞长满后,按 $1 \times 10^5$ 个/孔的密度铺于12孔板中,待细胞汇合至75%~80%时,将各组重组质粒、Lipofectamine™ 2000分别稀释于无FBS培养基中,转染组分为:A:mimics NC组、miR-320d mimics组、inhibitor NC组、miR-320d inhibitor组;B:siRNA NC组、HNF1A-AS1 siRNA组、SOX4 siRNA组;C:siRNA NC + inhibitor NC组、HNF1A-AS1 siRNA + inhibitor NC组、miR-320d inhibitor + siRNA NC组、HNF1A-AS1 siRNA + miR-320d inhibitor组;D:HNF1A-AS1 wt + miR-320d组、HNF1A-AS1 wt + mimics control组、HNF1A-AS1 mut + miR-34a组、HNF1A-AS1 mut + mimics control组;E:SOX4 wt + miR-320d组、SOX4 wt + mimics control组、SOX4 mut + miR-34a组、SOX4 mut + mimics control组。于室温孵育5 min,将稀释后的重组质粒和脂质体混匀,室温孵育15 min,将混合物小心滴加到细胞中,转染48 h后收集各组细胞RNA样和蛋白样进行生物学功能实验。

1.2.3 细胞增殖测定 取生长状态良好的细胞,当细胞密度达95%时,PBS清洗3次,用2.5 g/mL胰酶消化细胞,按 $1 \times 10^5$ 个/mL的密度铺于96孔板中,观察细胞汇合达70%~80%时,使用Lipofectamine™ 2000转染质粒,每组重复6个,于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养48 h后弃上清,PBS清洗2次,每孔加入10 μL CCK-8工作液,继续培养5 h,在酶标仪上读取各孔在450 nm处的吸光值。

1.2.4 双荧光素酶报告基因活性检测 采用miRanda和TargetScan生物信息学软件预测HNF1A-AS1和miR-320d潜在靶基因,PCR扩增HNF1A-AS1 3'UTR

片段和 SOX4 3' UTR 片段, 构建 HNF1A-AS1 野生型 (HNF1A-AS1 wt) 和 SOX4 野生型 (SOX4 wt) 载体。再通过点突变试剂盒构建 HNF1A-AS1 和 SOX4 突变重组质粒。按照 Lipofectamine™2000 转染说明书转染各组重组质粒, 采用双荧光素酶活性检测试剂盒检测 C33A 细胞的荧光素酶活性。

1.2.5 流式细胞仪检测宫颈癌细胞的凋亡率 将各组重组质粒使用 Lipofectamine™2000 转染至 C33A 细胞, 胰酶消化后, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基进行中和, 1 000 r/min 离心 10 min 后弃上清, PBS 清洗 3 次, 沉淀置于 70% 的乙醇中, 4℃ 固定过夜, 用流式细胞仪检测各组细胞的细胞凋亡水平, 收集数据进行显著性分析。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 收取转染重组质粒的细胞 RNA 样, 使用 Trizol 试剂在无 RNA 酶条件下从细胞中抽提总 RNA, 使用 Takara 反转录试剂盒反转成 cDNA, 按照 42℃, 2 min; 37℃ 15 min, 85℃ 5 s 的程序进行反应, 逆转录得到的 cDNA 为模板, 进行 RT-qPCR, 反应程序为 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环。使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析实验结果, 并以 U6 表达作为内参照。实验所用的引物见表 1。

表 1 引物序列	
引物	序列(5'→3')
HNF1A-AS1-F	TCAAGAAATGCTGGCTAT
HNF1A-AS1-R	GATCTGAGACTGGCTGAA
miR-320d-F	ACACTCCAGCTGGGAAAAGCTGGGTTGAGA
miR-320d-R	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAA TTCAGTTGAGTCTCTCA
SOX4-F	GACCTGCTCGACCTGAACC
SOX4-R	CCGGGCTCGAAG TTAATTC
GAPDH-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
GAPDH-R	GGGGTCGTTGATGGCAACA
U6-F	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC
U6-R	TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG

1.2.7 Western blot 收取转染重组质粒的细胞蛋白样, 使用 RIPA 充分裂解细胞, 收集蛋白上清液, 使用 BCA 试剂盒测定上清蛋白质浓度, 取适量样品进行点样, 并按照 80 V 35 min、115 V 2 h 的程序进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。结束后采用湿转将蛋白湿转到 PVDF 膜上。转膜完成后, 将 PVDF 膜置于封闭液 (50 g/L 脱脂奶粉配制) 中, 在室温摇床封闭 2 h, 封闭后的 PVDF 膜与一抗中在 4℃ 过夜孵育, TBST 清洗 5 次, 每次 5 min, 一抗孵育结束后, 将膜放在特异性二抗中, 室温摇床孵育 1.5 h, TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 清洗干净后进行目的蛋白曝光。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件处理数据, 至少取 3 次独立实

验结果。组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-320d 抑制 C33A 细胞增殖和 EMT, 促进 C33A 细胞的凋亡

由图 1A 可知, C33A 细胞中 miR-320d 的表达量低于 H8 细胞 (*t* = 8.139, *P* = 0.0148)。由图 1B 可知, 和 mimics NC 组相比, miR-320d mimics 组的 miR-320d 表达量明显升高 (*t* = 20.79, *P* = 0.0023)。由图 1C MTT 实验结果可知, miR-320d mimics 组的细胞增殖能力低于 mimics NC 组 (*t* = 6.081, *P* = 0.0260)。由图 1D、1E 可知, miR-320d mimics 组的细胞凋亡率明显高于 mimics NC 组 (*t* = 15.52, *P* = 0.0041)。由图 1F ~ 1I 可知, 和 mimics NC 组相比, miR-320d mimics 组的 Bax、E-cadherin 蛋白表达量明显上升 (*t* = 12.67, *P* = 0.0062), Bcl-2 和 N-cadherin 蛋白表达量下降 (*t* = 6.281, *P* = 0.0237), 以上结果表明 miR-320d 能够抑制 C33A 细胞的增殖和 EMT, 促进 C33A 细胞的凋亡。

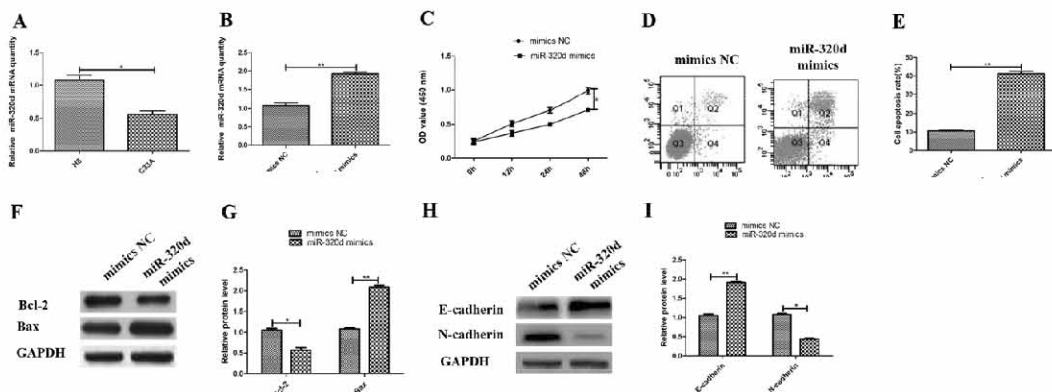
2.2 HNF1A-AS1 通过调控 miR-320d 表达促进 C33A 细胞增殖和 EMT, 抑制细胞凋亡

miRanda 预测 HNF1A-AS1 和 miR-320d 之间的结合位点见图 2A。图 2B 结果可知, 当质粒携带 HNF1A-AS1 3' UTR wt 时, miR-320d 的荧光素酶活性显著降低 (*t* = 19.70, *P* = 0.0026); 当质粒携带 HNF1A-AS1 3' UTR mut 时, miR-320d 的荧光素酶活性无变化 (*P* > 0.05)。由图 2C 可知, C33A 细胞中 HNF1A-AS1 的表达量明显高于 H8 细胞 (*t* = 18.31, *P* = 0.0030); 由图 2D ~ 2E 可知, 与 siRNA NC 相比, HNF1A-AS1 siRNA 组 HNF1A-AS1 的基因表达量下降 (*t* = 6.893, *P* = 0.0204), 而 miR-320d 的基因表达量上升 (*t* = 8.839, *P* = 0.0126), 说明 HNF1A-AS1 和 miR-320d 之间存在负调控关系。由图 2F ~ 2J 可知, 和 siRNA NC + inhibitor NC 组相比, HNF1A-AS1 siRNA + inhibitor NC 组细胞增殖能力下降 (*t* = 5.367, *P* = 0.0330), Bax、E-cadherin 蛋白表达量明显上升 (*t* = 24.31, *P* = 0.0017), Bcl-2 和 N-cadherin 蛋白表达量明显下降 (*t* = 25.64, *P* = 0.0015), miR-320d inhibitor + siRNA NC 组细胞增殖能力上升 (*t* = 5.518, *P* = 0.0030), Bax、E-cadherin 蛋白表达量明显下降 (*t* = 25.25, *P* = 0.0016), Bcl-2 和 N-cadherin 蛋白表达量明显上升 (*t* = 25.25, *P* = 0.0013); 与 miR-320d inhibitor + siRNA NC 组相比, HNF1A-AS1 siRNA + miR-320d inhibitor 组细胞增殖能力下降 (*t* = 7.279, *P* = 0.0184), Bax、E-cadherin 蛋白表达量明显上升 (*t* = 18.11, *P* = 0.0030), Bcl-2 和 N-cadherin 蛋白表达量明显下降 (*t* = 23.71, *P* = 0.0018)。以上结果说明 HNF1A-AS1 通过调控 miR-320d 表达促进 C33A 细胞增殖和 EMT, 抑制细胞凋亡。

### 2.3 SOX4 是 miR-320d 在 C33A 细胞中的下游靶点

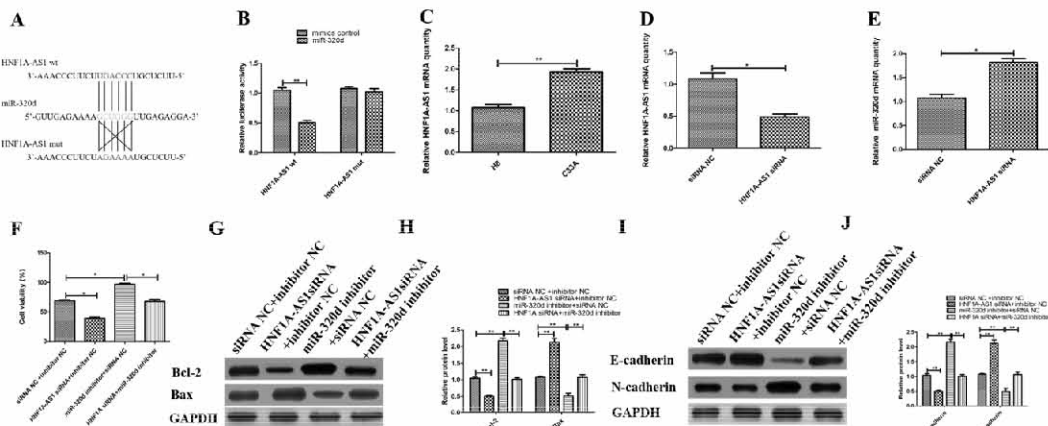
预测 miR-320d 和 SOX4 之间的结合位点见图 3A, 由图 3B 结果可知, 当质粒携带 SOX4 3'UTR wt 时, miR-320d 的荧光素酶活性显著降低 ( $t = 12.62, P = 0.0062$ ),

当质粒携带 SOX4 3'UTR mut 时, miR-320d 的荧光素酶活性无变化 ( $t = 3.280, P = 0.0817$ )。以上结果表明 SOX4 是 miR-320d 在 C33A 细胞中的下游靶点。



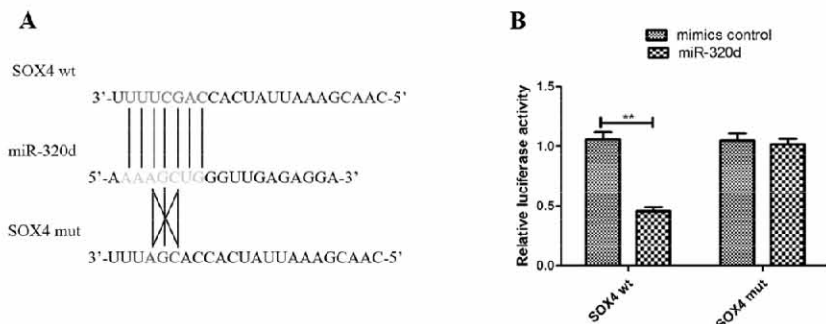
A: RT-qPCR 检测 miR-320d 在 C33A 和 H8 细胞中的表达量; B: RT-qPCR 检测 miR-320d 的相对表达量; C: MTT 检测 miR-320d 对 C33A 细胞增殖的影响; D: 流式细胞仪检测 miR-320d 对 C33A 细胞凋亡的影响; E: C33A 细胞凋亡率; F: Western blot 检测 Bcl-2、Bax 的蛋白表达量; G: Bcl-2、Bax 蛋白相对表达量; H: Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin 的蛋白表达量; I: E-cadherin、N-cadherin 蛋白的相对表达量 (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ;  $n = 3$ ) (注: “ $n$ ” 是代表每个实验重复 3 次, 下同)

图 1 miR-320d 抑制 C33A 细胞增殖和 EMT, 促进 C33A 细胞的凋亡



A: miRanda 预测 HNF1A-AS1 和 miR-320d 之间的结合位点; B: 荧光素酶表达量的测定; C: RT-qPCR 检测 HNF1A-AS1 在 C33A 和 H8 细胞中的表达量; D: RT-qPCR 检测 HNF1A-AS1 的表达量; E: RT-qPCR 检测 miR-320d 的表达量; F: MTT 检测 HNF1A-AS1 通过 miR-320d 对 C33A 细胞增殖的影响; G: Western blot 检测 Bcl-2、Bax 的蛋白表达量; H: Bcl-2、Bax 蛋白相对表达量; I: Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin 蛋白的表达量; J: E-cadherin、N-cadherin 蛋白的相对表达量 (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ;  $n = 3$ )

图 2 HNF1A-AS1 通过调控 miR-320d 表达促进 C33A 细胞增殖和 EMT, 抑制细胞凋亡



A: TargetScan 预测 miR-320d 和 SOX4 之间的结合位点; B: 荧光素酶表达量的测定; (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ;  $n = 3$ )

图 3 SOX4 是 miR-320d 在 C33A 细胞中的下游靶点

2.4 SOX4 促进 C33A 细胞增殖和 EMT,抑制 C33A 细胞的凋亡

由图 4A 可知,C33A 细胞中 SOX4 的表达量明显高于 H8 细胞( $t=20.87,P=0.0023$ )。如图 4B 显示,和 siRNA NC 组相比,SOX4 siRNA 的表达量明显降低( $t=18.48,P=0.0029$ )。由图 4C~4I 结果可知,SOX4 siRNA 组细胞的增殖能力低于 siRNA NC 组( $t=8.728,P=0.0129$ ),凋亡率明显高于 siRNA NC 组( $t=13.10,P=0.0058$ ),Bax、E-cadherin 蛋白表达量明显上升( $t=48.78,P=0.0004$ ),Bcl-2、N-cadherin 蛋白表达量下降( $t=7.778,P=0.0161$ ),表明 SOX4 能够促进 C33A 细胞的增殖和 EMT,抑制 C33A 细胞的凋亡。

2.5 HNF1A-AS1 通过 miR-320d 调控 SOX4 的表达

由图 5A 可知,和 siRNA NC 组相比,HNF1A-AS1 siRNA 组的 SOX4 表达量降低( $t=4.664,P=0.0430$ );和 inhibitor NC 组相比,miR-320d inhibitor 组的 SOX4 表达量明显升高( $t=13.56,P=0.0054$ );由图 5B~5C 可知,和 siRNA NC + inhibitor NC 组相比,HNF1A-AS1 siRNA + inhibitor NC 组 SOX4 蛋白表达量降低

( $t=8.728,P=0.0129$ ),miR-320d inhibitor + siRNA NC 组 SOX4 蛋白表达量明显上升( $t=15.41,P=0.0042$ );和 miR-320d inhibitor + siRNA NC 组相比,HNF1A-AS1 siRNA + miR-320d inhibitor 组 SOX4 蛋白表达量降低( $t=5.692,P=0.0295$ )。以上结果说明 HNF1A-AS1 通过 miR-320d 调控 SOX4 的表达。

3 讨论

最近越来越多的研究发现,在癌症的发生发展过程中,miRNA 的异常表达可能作为癌基因或抑癌基因发挥重要的作用。大量研究报道了在宫颈癌中异常表达的 miRNA,如在宫颈癌缺氧条件下,microRNA-519d-3p 通过靶向 HIF-2 抑制细胞增殖和促进细胞凋亡<sup>[9]</sup>。miR-152 在宫颈癌中具有抑癌功能,miR-152/KLF 5 轴可能为宫颈癌治疗提供新的治疗靶点<sup>[10]</sup>。此外,miRNA-489 能够作为宫颈癌诊断和治疗的生物标志物<sup>[11]</sup>。miR-320d 作为 miR-320 家族的重要成员,已有研究报道 miR-320d 在胶质瘤、乳腺癌、结直肠腺瘤和 B 细胞淋巴瘤中的作用<sup>[12-13]</sup>。而在本研究中,我们探讨了 miR-320d 在宫颈癌

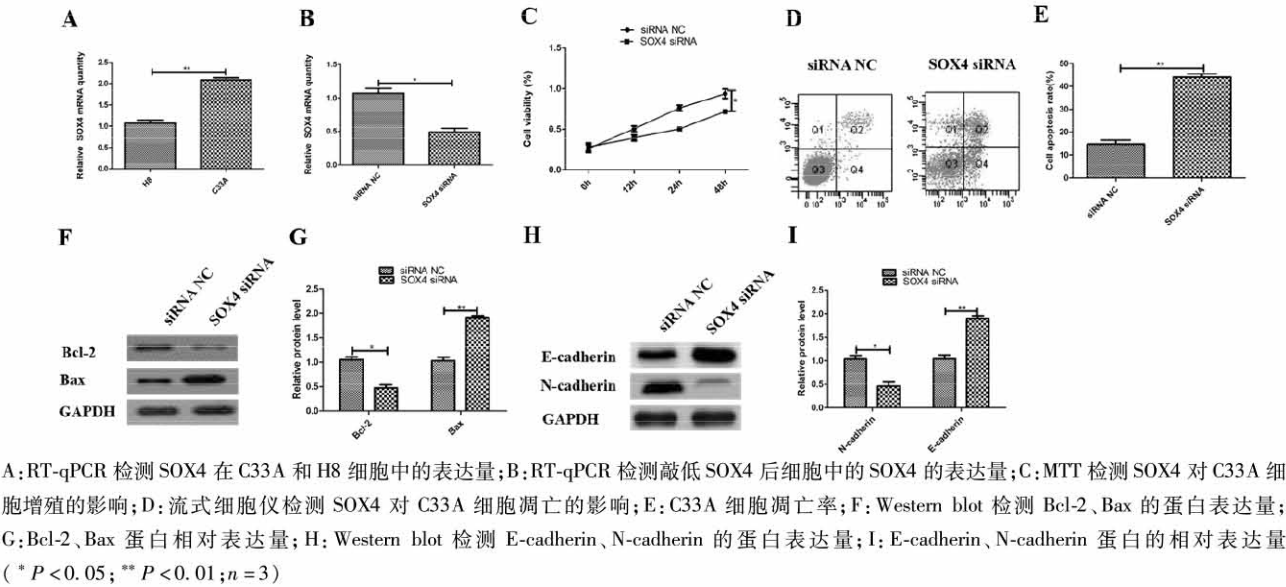


图 4 SOX4 促进 C33A 细胞增殖和 EMT,抑制 C33A 细胞的凋亡

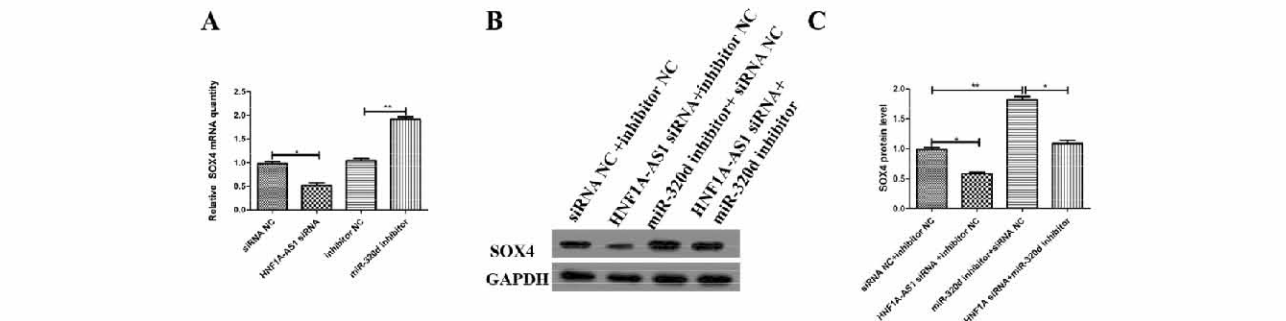


图 5 HNF1A-AS1 通过 miR-320d 调控 SOX4 的表达



中的临床意义,并研究了其在宫颈癌细胞增殖、凋亡和EMT中的作用。结果表明,miR-320d在宫颈癌细胞中的表达明显低于正常细胞,过表达miR-320d能够抑制宫颈癌细胞的增殖、EMT和促进细胞凋亡。因此,miR-320d可能在宫颈癌中发挥抑癌作用。

大量研究表明,lncRNA能够作为宫颈癌的诊断和预后标志物参与癌症的发生发展。例如,lncRNA MALAT-1在宫颈癌中过表达,促进癌细胞的增殖、侵袭和迁移<sup>[14]</sup>。长链非编码RNA TUG1的上调促进了宫颈癌细胞的增殖和迁移<sup>[15]</sup>。HNF1A-AS1作为很重要的lncRNA首次在人原发性食管腺癌中发现异常表达<sup>[16]</sup>。另外发现HNF1A-AS1在肺腺癌、肝细胞癌和骨肉瘤中也表达上调,能够作为癌基因发挥作用<sup>[17-18]</sup>。本研究首先通过生物信息学分析发现miR-320d在HNF1A-AS1 3'UTR中的靶位点。此外,和正常细胞相比,宫颈癌细胞中HNF1A-AS1表达上调,敲低HNF1A-AS1增加了miR-320d的表达,抑制了宫颈癌细胞增殖的EMT,促进了癌细胞的凋亡。表明HNF1A-AS1通过下调miR-320d在宫颈癌进展中的表达,起到致癌基因的作用。SOX4是SOX家族中的一员,在调控癌症发展方面起着重要作用。研究发现SOX4在各种癌症中都有上调,如miR-129-2通过下调SOX4的表达来抑制食管癌细胞的增殖和迁移;miR-132通过靶向SOX4抑制肺癌细胞迁移和侵袭<sup>[19]</sup>;SOX4能够诱导上皮-间质转化,促进乳腺癌进展<sup>[20]</sup>。据报道,SOX4的表达在转录后受到miR-187、miR-204和miR-363等miRNA的调控,而在本研究中,SOX4被预测为miR-320d的下游靶点。SOX4在宫颈癌细胞中表达上调,敲低SOX4能够抑制宫颈癌细胞的增殖和EMT,促进癌细胞的凋亡。此外,本研究结果表明,宫颈癌细胞中SOX4的水平与HNF1A-AS1呈正相关,与miR-320d呈负相关,HNF1A-AS1能够通过miR-320d调控SOX4的表达。

综上所述,lncRNA HNF1A-AS1在宫颈癌中起促癌作用,并通过miR-320d/SOX4轴促进宫颈癌的发展。本实验数据也表明,HNF1A-AS1/miR-320d/SOX4轴可能是宫颈癌的一个有希望的治疗靶点。

## 【参考文献】

- [1] 常佳豪,黄夏曼,陈威,等. 宫颈癌的研究进展[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版),2017,13(4):486-489.
- [2] Zhang C, Ma M H, Liang Y, et al. Novel long non-coding RNA LINC02532 promotes gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion in vitro [J]. World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2019,11(2):24-34.
- [3] Li D, Yang C, Yin C, et al. LncRNA, important player in bone development and disease [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2020,20(1):50-66.
- [4] Ahmadi S, Zobeiri M, Bradburn S. Molecular mechanisms underlying actions of certain long noncoding RNAs in Alzheimer's disease [J].

- Metabolic Brain Disease, 2020,35(5):681-693.
- [5] Yang L, Tang Y, Xiong F, et al. LncRNAs regulate cancer metastasis via binding to functional proteins [J]. Oncotarget, 2018,9(1):1426-1443.
- [6] Rathinasamy B, Velmurugan B K. Role of lncRNAs in the cancer development and progression and their regulation by various phytochemicals [J]. Biomed Pharmacother, 2018,102:242-248.
- [7] Liu Z, Li H, Fan S, et al. STAT3-induced upregulation of long noncoding RNA HNF1A-AS1 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma via activating Notch signaling pathway [J]. Cancer Biol Ther, 2019,20(4):444-453.
- [8] 邱云,郭中叶,吴学潮,等. LncRNA HNF1A-AS1在胶质瘤中的表达及功能研究[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2020,25(3):126-131.
- [9] Jiang LX, Shi SH, Shi QF, et al. MicroRNA-519d-3p inhibits proliferation and promotes apoptosis by targeting HIF-2 $\alpha$  in cervical cancer under hypoxic conditions [J]. Oncology Research, 2018,26(7):1055-1062.
- [10] Zhang H, Lu Y, Wang S, et al. MicroRNA-152 acts as a tumor suppressor microRNA by inhibiting krüppel-like factor 5 in human cervical cancer [J]. Oncol Res, 2019,27(3):335-340.
- [11] Juan C, Hua Q, Ruping Z, et al. miRNA-489 as a biomarker in diagnosis and treatment of cervical cancer [J]. Bratisl Lek Listy, 2018,119(5):278-283.
- [12] Liu X, Xu X, Pan B, et al. Circulating miR-1290 and miR-320d as novel diagnostic biomarkers of human colorectal cancer [J]. J Cancer, 2019,10(1):43-50.
- [13] 武鹏艳,郝彦凤,王晋芬,等. miR-320d与弥漫大B细胞淋巴瘤预后相关性研究[J]. 白血病·淋巴瘤, 2014,23(10):607-610.
- [14] Zhang Y, Wang T, Huang H Q, et al. Human MALAT-1 long non-coding RNA is overexpressed in cervical cancer metastasis and promotes cells proliferation, apoptosis and migration [J]. J BUON, 2016,20(6):1497-1503.
- [15] Hu Y, Sun X, Mao C, et al. Upregulation of long noncoding RNA TUG1 promotes cervical cancer cells proliferation and migration [J]. Cancer Medicine, 2017,6(2):471-482.
- [16] Yang X, Song JH, Cheng Y, et al. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 regulates proliferation and migration in oesophageal adenocarcinoma cells [J]. Gut, 2014,63(6):881-890.
- [17] Liu Z, Wei X, Zhang A, et al. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 functioned as an oncogene and autophagy promoter in hepatocellular carcinoma through sponging hsa-miR-30b-5p, Biochem [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016,473(4):1268-1275.
- [18] Zhao HX, Hou WG, Tao JG, et al. Upregulation of lncRNA HNF1A-AS1 promotes cells proliferation and metastasis in osteosarcoma through activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. Am J Transl Res, 2016,8(8):3503-3512.
- [19] Li Y, Zu L, Wang Y, et al. MiR-132 inhibits lung cancer cells migration and apoptosis by targeting SOX4 [J]. J Thorac Dis, 2015,7(9):1563-1569.
- [20] Zhang J, Liang Q, Lei Y, et al. SOX4 induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to breast cancer progression [J]. Cancer Res, 2012,72(7):4597-4608.