

DNA 甲基化介导 miR-128-2 沉默对子宫内膜癌细胞中 DJ-1 表达的影响

朱其舟¹, 李慧娟², 肖仲清¹, 龙生根¹, 陈和平³, 舒宽勇^{1*}

基金项目: 1. 国家自然科学基金资助项目(项目编号: 81760473); 2. 江西省卫健委科技计划资助项目(项目编号: SKJP_220219589)

作者单位: 1. 330008 江西 南昌, 江西省妇幼保健院肿瘤科; 2. 330008 江西 南昌, 江西省妇幼保健院医务部;

3. 330006 江西 南昌, 南昌大学江西医学院药学院基础药理重点实验室

作者简介: 朱其舟, 毕业于南昌大学江西医学院, 临床医学博士, 副主任医师, 主要研究方向为子宫内膜癌的基础和临床研究

* 通信作者, E-mail: shukuanyong@163.com

【摘要】目的 在子宫内膜癌细胞系水平, 进一步明确上调子宫内膜癌细胞内 DJ-1 表达的重要调控机制。

方法 1. 利用正常人子宫内膜上皮细胞(ESC)和4种子宫内膜癌细胞株, 检测细胞中 miR-128-2 基因启动子区 DNA 甲基化的水平、miR-128-2、DJ-1 mRNA 及 DJ-1 蛋白表达水平, 比较分析它们在不同的子宫内膜癌细胞系中的差异变化及相关性。2. 将 miR-128-2 mimic 和 miR-128-2 inhibitor 依次分别转染 Ishikawa 和 SPEC-2 子宫内膜癌细胞株, 测定细胞中 miR-128-2、DJ-1 mRNA 及 DJ-1 蛋白表达水平的变化, 以求阐明 miR-128-2 是否能调控内源性 DJ-1 表达。3. 分别构建含野生型 DJ-1-3' UTR 的重组荧光素酶报告载体 pGL3-DJ-1-3' UTR-wt 和含有突变型 DJ-1-3' UTR 的重组荧光素酶报告载体 pGL3-DJ-1-3' UTR-mut, 验证 DJ-1 是否为 miR-128-2 直接靶基因。4. Ishikawa 和 SPEC-2 子宫内膜癌细胞经 5 μ M 甲基化抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dC) 药物预处理 48 h 或 5-Aza-dC 预处理后再转染 miR-128-2 inhibitor 48 h, 随后检测 miR-128-2 基因启动子 DNA 甲基化水平的变化、miR-128-2 和 DJ-1 mRNA 表达丰度的变化、DJ-1 蛋白的表达水平变化, 以求阐明子宫内膜癌细胞中 miR-128-2 基因启动子 DNA 甲基化是否沉默 miR-128-2 表达进而上调 DJ-1 表达。结果 1. 与正常 ESC 相比较, Ishikawa、RL95-2、KLE 及 SPEC-2 四种子宫内膜癌细胞中 miR-128-2 基因启动子区 DNA 甲基化水平均显著增加($P < 0.01$), 同时 miR-128-2 表达明显下调($P < 0.01$), 而 DJ-1 mRNA 及蛋白表达显著增加($P < 0.01$); 通过相关性分析发现 miR-128-2 甲基化水平与 miR-128-2 表达具有显著负相关性($r = -0.9124$, $P < 0.01$), 而与 DJ-1 mRNA 表达具有显著正相关性($r = 0.8304$, $P < 0.01$); 此外, miR-128-2 表达与 DJ-1 mRNA 的表达表现为负相关性($r = -0.8963$, $P < 0.01$)。2. Ishikawa 和 SPEC-2 细胞中转染 miR-128-2 inhibitor 后, DJ-1 mRNA 及蛋白表达水平较对照组均有明显升高($P < 0.01$), 而 miR-128-2 mimic 转染细胞后, DJ-1 mRNA 及蛋白表达水平较对照组均出现明显下降($P < 0.01$)。3. miR-128-2 mimic 转染细胞后, 重组报告质粒 pGL3-DJ-1-3' UTR-wt 的荧光素酶活性大幅降低($P < 0.01$), 但 miR-128-2 mimic 对重组报告质粒 pGL3-DJ-1-3' UTR-mut 的荧光素酶活性却无法产生作用($P > 0.05$), 提示 miR-128-2 可直接与 DJ-1 3' UTR 靶向结合。4. 经 5 μ M 甲基化抑制剂 5-Aza-dC 预处理 48 h 后, Ishikawa 及 SPEC-2 细胞中 miR-128-2 甲基化水平均显著下降($P < 0.01$), miR-128-2 表达均显著上升, 而 DJ-1 mRNA 和蛋白表达水平均显著下降($P < 0.01$)。此外, 5-Aza-dC 预处理上调 miR-128-2 表达并下调 DJ-1 mRNA 和蛋白表达的作用可被 miR-128-2 inhibitor 所逆转($P < 0.01$), 然而, 5-Aza-dC 预处理降低 miR-128-2 甲基化水平的作用却未能被 miR-128-2 inhibitor 影响。结论 子宫内膜癌细胞中 DJ-1 的表达可由 miR-128-2 直接靶向负调控; miR-128-2 基因启动子区 DNA 甲基化致 miR-128-2 表达沉默可能是子宫内膜癌细胞中上调 DJ-1 表达的关键机制。

【关键词】miR-128-2; DNA 甲基化; DJ-1; 子宫内膜癌细胞; 5-Aza-dC

【中图分类号】R 711.74; R 73-3

【文献标志码】A

【文章编号】1674-4020(2024)04-066-06

doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2024.04.13

Effect of miR-128-2 silencing mediated by DNA methylation on the expression of DJ-1 in endometrial cancer cells

Zhu Qizhou¹, Li Huijuan², Xiao Zhongqing¹, Long Shenggen¹, Chen Heping³, Shu Kuanyong^{1*}

1. Department of Gynecological Oncology, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital Nanchang Jiangxi 330008; 2. Medical

Department, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanchang Jiangxi 330008; 3. Key Laboratory of Basic Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Jiangxi Medical College of Nanchang University, Nanchang Jiangxi 330006, P. R. China

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

【Abstract】Objective To further clarify the important regulatory mechanism for the up-regulation of DJ-1 expression in EC cells. **Methods** 1. The levels of DNA methylation in the promoter region of miR-128-2 gene and the expression levels of miR-128-2, DJ-1 mRNA and DJ-1 protein in normal human endometrial epithelial cells (ESC) and four endometrial cancer cell lines were detected, and their differences and correlations in different endometrial cancer cell lines were compared and analyzed. 2. MiR-128-2 mimic and miR-128-2 inhibitor were transfected into Ishikawa and SPEC-2 endometrial cancer cell lines, respectively. The expression levels of miR-128-2, DJ-1 mRNA and DJ-1 protein in the cells were measured to clarify whether miR-128-2 can regulate the expression of endogenous DJ-1. 3. The recombinant luciferase reporter vectors (pGL3-DJ-1-3'UTR-wt containing wild-type DJ-1-3'UTR and pGL3-DJ-1-3'UTR-mut containing mutant DJ-1-3'UTR) were constructed. The vectors (DJ-1-3'UTR-wt and DJ-1-3'UTR-mut) were constructed to verify whether DJ-1 is a direct target gene of miR-128-2. 4. Ishikawa and SPEC-2 endometrial cancer cells were pretreated with 5 μ M methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) for 48 h or pretreated with 5-Aza-dC and then transfected with miR-128-2 inhibitor for 48 h. The changes of DNA methylation level of miR-128-2 gene promoter, the expression abundance of miR-128-2 and DJ-1 mRNA, and the expression level of DJ-1 protein were detected. In order to clarify whether the DNA methylation of miR-128-2 gene promoter in endometrial cancer cells silences the expression of miR-128-2 and up-regulates the expression of DJ-1. **Results** 1. Comparing with ESC cells, the degree of miR-128-2 promoter DNA methylation were significantly increased in four different human EC cell lines (Ishikawa, RL95-2, KLE, and SPEC-2) ($P < 0.01$); Meanwhile, the miR-128-2 expression was decreased, while the DJ-1 mRNA and protein expressions were up-regulated ($P < 0.01$). Through correlation analysis, it was found that the methylation level of miR-128-2 was significantly inversely correlated with miR-128-2 expression ($r = -0.9124$, $P < 0.01$), and correlated with the DJ-1 mRNA expression positively ($r = 0.8304$, $P < 0.01$). In addition, the expression level of miR-128-2 was inversely correlated with that of DJ-1 mRNA ($r = -0.8963$, $P < 0.01$). 2. With miR-128-2 inhibitor transfecting in Ishikawa and SPEC-2 cells, DJ-1 mRNA and protein expression levels were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). While miR-128-2 mimic transfected cells, the expression levels of DJ-1 mRNA and protein were significantly down-regulated compared with the control group ($P < 0.01$). 3. After transfection of miR-128-2 mimic into cells, the luciferase activity of the recombinant reporter plasmid PGL3-DJ-1-3'UTR-wt was significantly reduced ($P < 0.01$). However, miR-128-2 mimic had no effect on the luciferase activity of the recombinant reporter plasmid PGL3-DJ-1-3'UTR-mut ($P > 0.05$). The results suggested that miR-128-2 might bind to the DJ-1 3'UTR directly. 4. After pretreatment Ishikawa and SPEC-2 cells for 48 h with 5 μ M 5-Aza-dC, the level of miR-128-2 promoter DNA methylation was significantly decreased ($P < 0.01$); Meanwhile, the expression of miR-128-2 was increased, at the same time DJ-1 mRNA/protein expressions were decreased ($P < 0.01$). Interestingly, we found that the miR-128-2 up-regulation or the DJ-1 mRNA/protein down-regulation following 5-Aza-dC pretreatment could be reversed by miR-128-2 inhibitor ($P < 0.01$), but the reduction of miR-128-2 methylation by 5-Aza-dC pretreatment was not affected by miR-128-2 inhibitor. **Conclusion** miR-128-2 can directly target and negatively regulate DJ-1 expression in EC cells. DNA methylation-mediated silencing of miR-128-2 expression maybe a crucial regulatory mechanism for up-regulation of DJ-1 expression in EC cells.

【Key words】miR-128-2; DNA methylation; DJ-1; endometrial cancer cells; 5-Aza-dC

子宫内膜癌是全球女性最常罹患的三大妇科癌症之一^[1]。前期研究^[2]中我们在组织学水平上通过实验表明了子宫内膜癌组织中 miR-128-2 基因启动子区 DNA 甲基化水平较对应的癌旁组织明显增高,而 miR-128-2 表达水平则较对应的癌旁组织显著降低,且二者呈负相关。此外,我们还证明了 DJ-1 异常高表达于子宫内膜癌组织及细胞中^[3,4],同时发现子宫内膜癌组织中 DJ-1 mRNA 表达水平与 miR-128-2 表达水平负相关,与 miR-128-2 基因启动子区 DNA 甲基化水平正相关^[2]。然而,子宫内膜癌中 miR-128-2 基因启动子 DNA 甲基化、miR-128-2 表达以及 DJ-1 表达三者之间的直接上下游调控关系有待进一步明确。为此,本研究拟在子宫内膜癌细胞系水平,借助 DNA 甲基化抑制剂预处理、miR-128-2 mimic 及 inhibitor 等转染细胞,进一步明确子宫内膜癌细胞中上调 DJ-1 表达是否为 miR-128-2 基因启动子区 DNA 甲基化使其表达沉默所致。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株、miRNA 模拟物与抑制剂以及重组荧光素酶报告质粒

(1) 4 株人子宫内膜癌细胞系 Ishikawa、RL95-2、KLE 及 SPEC-2 (Ishikawa、RL95-2 及 KLE 为分化程度不同的 I 型子宫内膜癌细胞系, SPEC-2 为 II 型子宫内膜癌细胞系) 和人子宫内膜上皮细胞系 ESC 均购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。

(2) miR-128-2 mimic、mimic-NC (Negative Control, 阴性对照)、miR-128-2 inhibitor 及 inhibitor-NC 均购于 Thermo Fisher Scientific 公司 (Catalog # 4464066 和 Catalog # 4464084)。

(3) 含野生型 DJ-1-3'UTR (3'untranslated region) 的重组荧光素酶报告质粒 pGL3-DJ-1-3'UTR-wt 和含有突变型 DJ-1-3'UTR 的重组荧光素酶报告质粒 pGL3-DJ-1-3

3'UTR-mut 由上海吉凯基因医学科技有限公司构建合成。

1.1.2 主要试剂

(1) 细胞培养有关试剂

DMEM/F12(1:1)	美国 Gibco 公司
无血清细胞冻存液	北京索莱宝科技有限公司
胎牛血清	澳大利亚 CellMax 公司
青霉素	美国 Sigma 公司
链霉素	美国 Sigma 公司
胰蛋白酶	北京索莱宝科技有限公司
二甲基亚砷	美国 Sigma 公司

(2) 荧光素酶报告实验有关试剂

① 转染试剂 OPTI-MEM 和 Lipo2000 购自美国 Thermo 公司。

② 双荧光素酶报告实验检测试剂盒 Dual-Luciferase Reporter Assay System 购自美国普洛麦格公司。

1.1.3 主要试剂的配制

(1) miR-128-2 mimic、mimic-NC 及 miR-128-2 inhibitor、inhibitor-NC 干粉,以 DEPC 处理无酶水溶解,制备成 0.5 μ M 浓度, -80℃ 超低温箱贮藏。

(2) 5-Aza-dC 储存液: DNA 甲基化抑制剂 5-Aza-dC (5-Aza-2'-deoxycytidine) 购于美国 Sigma 公司,以 0.1% 二甲基亚砷进行溶解制得储存液 10 mM,临用时,稀释终浓度为 5 μ M。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 按常规进行细胞复苏→细胞换液→细胞传代→细胞冻存→细胞计数。

1.2.2 DNA 甲基化抑制剂 5-Aza-dC 预处理细胞

5-Aza-dR 预处理细胞操作步骤如下:

(1) 5-Aza-dC 溶解于二甲基亚砷 (DMSO) 中,溶解浓度为 10 mM,储存于 -80℃ 超低温箱备用;

(2) 使用时用无血清培养基对 5-Aza-dC 贮存液进行稀释,制备 5 μ M 工作液;

(3) 接种细胞至 6 孔板中,待细胞生长达 70% ~ 90% 汇合度时,加入 5-Aza-dC 工作液使其终浓度为 5 μ M,同时设不加药的空白对照组。随后,细胞置入 5% CO₂ 恒温培养箱内 37℃ 下持续培养 48 h,再进行下一步实验。

1.2.3 miR-128-2 mimic 与 miR-128-2 inhibitor 细胞转染

miR-128-2 mimic、mimic-NC、miR-128-2 inhibitor、inhibitor-NC 细胞瞬时转染的方法严格依据 Lipofectamine™ 2000 说明书进行:

(1) 取 5×10^5 个对数生长期细胞,铺于 6 孔板,常规培养 24 h,待六孔板细胞融合度约为 70% ~ 80% 时进行转染;

(2) 取 5 μ L/孔 Lipofectamine™ 2000 (使用前恢复至室温,轻柔摇匀),稀释时以 Opti-MEM 减血清培养基 250 μ L 进行操作, (20 ± 5)℃ 下轻柔混合后孵育 5 min;

(3) miR-128-2 mimic、mimic-NC、miR-128-2 inhibitor

和 inhibitor-NC 各取 5 μ L,稀释时以 Opti-MEM 减血清培养基 250 μ L 进行操作, (20 ± 5)℃ 下轻柔混合后孵育 5 min;

(4) Lipofectamine™ 2000 经稀释后,再孵育 5 min,与已稀释的 miR-128-2 mimic、mimic-NC、miR-128-2 inhibitor 或 inhibitor-NC 轻柔混匀, (20 ± 5)℃ 下放置 20 min,使之成为混合物;

(5) 将混和液加至内含细胞及无血清培养液 (约 2.5 mL) 的孔中,轻柔摇晃孔板,将其充分混匀;

(6) 在 5% CO₂ 的细胞培养箱内 37℃ 下培养 6 h 后,用含血清的完全培养基替换旧培养基,持续培养 48 h,然后进行下一步操作。

1.2.4 qMSP 法检测子宫内膜癌细胞中 miR-128-2 基因启动子 DNA 甲基化水平 子宫内膜癌细胞 DNA 提取→亚硫酸氢盐修饰→定量甲基化特异性 PCR 检测

1.2.5 qRT-PCR 法检测子宫内膜癌细胞中 miR-128-2 和 DJ-1 mRNA 的表达水平 子宫内膜癌细胞中总 RNA 的提取→RNA 质量检测→miRNA 逆转录和实时定量 PCR 反应→mRNA 逆转录和实时定量 PCR 反应

1.2.6 Western Blot 法检测子宫内膜癌细胞中 DJ-1 蛋白表达 子宫内膜癌细胞中总蛋白的提取→蛋白浓度测定→蛋白样品的处理→SDS-PAGE→转膜→免疫反应→发光成像及分析。

1.2.7 荧光素酶报告基因实验

(1) DJ-1 3'UTR 荧光素酶基因报告质粒与 miR-128-2 mimic 或 mimic-NC 共转染细胞

① 24 孔板中接种指数生长期细胞, 2×10^4 个细胞/孔, 5% CO₂ 细胞培养箱内 37℃ 下培养 24 h,共转染操作应待细胞融合度达 70% ~ 80% 时进行;

② 将各 0.6 μ g 包含野生型 DJ-1-3'UTR 的重组荧光素酶报告质粒 pGL3-DJ-1-3'UTR-wt 或包含突变型 DJ-1-3'UTR 的重组荧光素酶报告基因质粒 pGL3-DJ-1-3'UTR-mut 分别与 3 μ L miR-128-2 mimic 或 mimic-NC 加入到 50 μ L Opti-MEM 中,使两者充分混合,室温孵育 5 min;

③ 将 2 μ L Lipofectamine™ 2000 加进 Opti-MEM 减血清培养基 50 μ L 中,彻底混匀后室温下进行 5 min 孵育;

④ 将②与③中的溶液混合,室温孵育 20 min;

⑤ 丢弃 24 孔板中的培养基, PBS 液清洗 × 2 遍,将步骤④混合溶液添加至 24 孔板的孔内,接着注入无血清培养基 400 μ L,充分混匀,放 37℃ 培养箱 6 h,以有血清培养基置换出旧培养基,持续 48 h 孵育后,收获细胞用于进行双荧光素酶启动子活性检测。

(2) 荧光素酶活性检测

参照 Promega 公司 Dual-Luciferase Reporter Assay System 说明书检测转染细胞的 Luciferae 活性:

① 收集细胞裂解液: 48 h 转染结束,丢弃培养基, PBS 液清洗 × 2 遍, PLB 按 100 μ L/孔进行添加,振荡器

轻柔摇匀 15 min, 细胞裂解液收集后置于冰面;

② 检测双荧光素酶启动子活性: 发光板中添加细胞裂解液 20 μ L 后, 借助多功能生物与化学发光检测仪, 测定其背景值 2.0 sec。各样本内添加 Luciferase Assay Reagent II 工作液 100 μ L, 迅即混均, 读值 2 sec 测定萤火虫荧光素酶(F)活性。随后, 各样品内添加 Stop&Glo Reagent 100 μ L, 迅即混均, 置入发光检测器中, 读值 2 sec 测定海肾荧光素酶(R)活性;

③ 计算相对荧光素酶活性: 相对荧光素酶活性 = F/R。

1.3 实验分组及流程

① 利用正常人子宫内膜上皮细胞(ESC)和 4 种子宫内膜癌细胞系(Ishikawa、RL95-2、KLE-SPEC-2), 分别检测 miR-128-2 基因启动子区 DNA 甲基化状态、miR-128-2 和 DJ-1 mRNA 的表达水平、DJ-1 在上述细胞株中的蛋白表达情况。

② 进一步明确子宫内癌细胞中 miR-128-2 DNA 甲基化、miR-128-2 表达以及 DJ-1 表达三者之间的调控关系, 验证子宫内癌细胞中 DJ-1 是否为 miR-128-2 的靶基因, 接着在生物信息学预测的基础上, 证实 DJ-1 是否就是 miR-128-2 的直接作用靶基因, 构建含有野生型 DJ-1 3'UTR 区结合位点的荧光素酶报告质粒 pGL3-DJ-1-3'UTR-wt 和含突变型 DJ-1 3'UTR 区结合位点的荧光素酶报告质粒 pGL3-DJ-1-3'UTR-mut, 并分别与 miR-128-2 mimic 共转染于子宫内癌细胞 Ishikawa 及 SPEC-2 中, 同时检测其荧光强度变化

③ 证实 miR-128-2 与 DJ-1 3'UTR 可特异性结合后, 进一步检测 miR-128-2 对子宫内癌细胞中 DJ-1 的表达是否具有调控作用。分别将 miR-128-2 inhibitor 和 miR-128-2 mimic 转染至 Ishikawa 和 SPEC-2 子宫内癌细胞株, 同时设对应的阴性对照组。

④ 明确 DJ-1 在子宫内癌细胞中上调表达是否为直接靶向调控 DJ-1 的 miR-128-2 分子的基因启动子区 DNA 甲基化所致, 进一步观察 DNA 甲基化抑制剂对子宫内癌细胞中 miR-128-2 及 DJ-1 表达水平所能产生的影响。

1.4 统计学方法

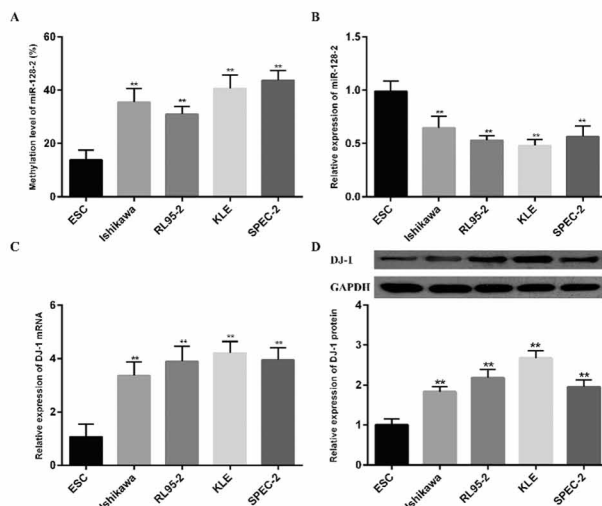
采用 GraphPad Prism 8.0 软件包处理数据及统计分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示各组计量资料数据, 两组比较采用两独立样本 *t* 检验, 多个样本比较采用单因素方差分析, LSD 法比较组间差异; 采用 Pearson 法行相关性分析; 取检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 子宫内癌细胞株中 miR-128-2 DNA 甲基化水平、miR-128-2 与 DJ-1 表达水平及三者相关性

与正常 ESC 相比, Ishikawa、RL95-2、KLE 及 SPEC-2 4 种子宫内癌细胞中 miR-128-2 基因启动子区 DNA 甲基化水平均显著增加(图 1A), 同时 miR-128-2 表达显

著下调(图 1B), 而 DJ-1 mRNA(图 1C)及蛋白(图 1D)的表达水平显著上调。通过相关性分析发现子宫内癌细胞中 miR-128-2 甲基化程度与其表达水平具有显著负相关性($r = -0.9124$, $P < 0.001$)(图 2A), 而与 DJ-1 mRNA 表达水平呈现显著正相关($r = 0.8304$, $P < 0.01$)(图 2B); miR-128-2 在 4 株癌细胞中的表达水平与 DJ-1 mRNA 的表达水平表现为显著负相关性($r = -0.8963$, $P < 0.01$)(图 2C)。



注: 数据以 4 个独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示, **表示与 ESCs 相比, $P < 0.01$

图 1 子宫内癌细胞株中 miR-128-2 甲基化水平 (A)、miR-128-2 (B) 和 DJ-1 mRNA (C) 表达水平、DJ-1 蛋白表达水平 (D)

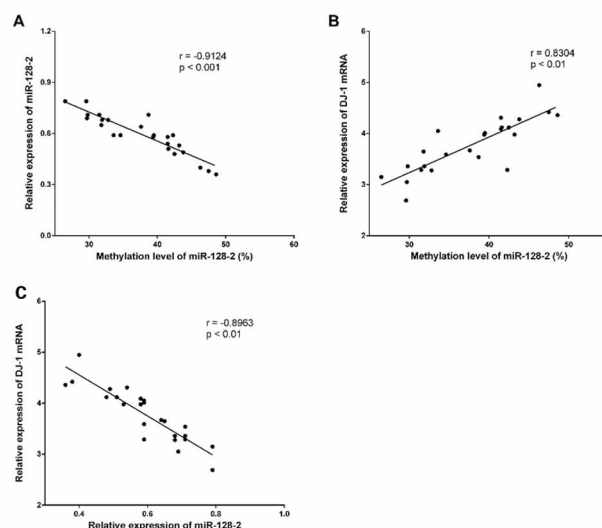


图 2 4 种 EC 细胞系中 miR-128-2 甲基化与 miR-128-2 mRNA 表达 (A) 和 DJ-1 mRNA 表达 (B) 之间的相关性; miR-128-2 表达和 DJ-1 mRNA 表达之间的相关性 (C)

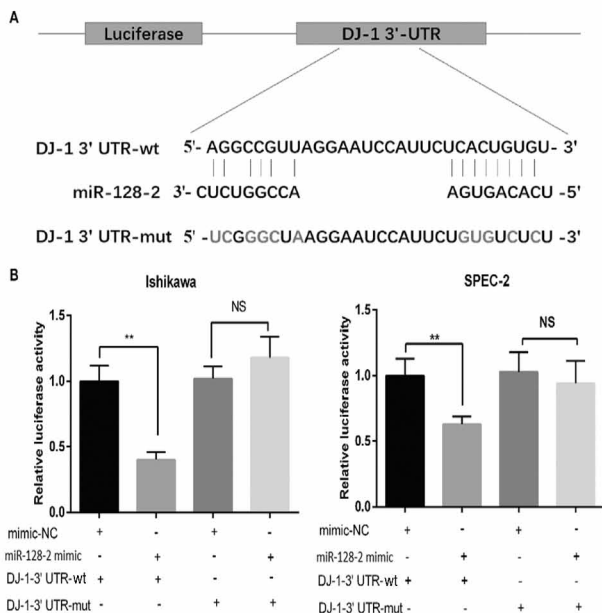
2.2 子宫内癌细胞中 DJ-1 为 miR-128-2 的靶基因验证结果

3 种预测工具 (microRNA.org、miRDB 及

TargetScanHuman 7.1)均显示 DJ-1 可能为 miR-128-2 的靶基因,在 TargetScanHuman 7.1 工具中发现 miR-128-2 与 DJ-1 3'UTR 区的存在结合位点(见图 3A)。验证结果见图 3B,共转染 pGL3-DJ-1-3'UTR-wt 和 miR-128-2 mimic 后,两种子宫内膜癌细胞株荧光素酶的活性均显著下降($P < 0.01$),而共转染突变质粒 pGL3-DJ-1-3'UTR-mut 与 miR-128-2 mimic 后,两种子宫内膜癌细胞株荧光素酶的活性均未受到明显影响($P > 0.05$)。

2.3 子宫内膜癌细胞中 miR-128-2 对 DJ-1 表达的调控作用

miR-128-2 抑制剂转染后,miR-128-2 在 Ishikawa 和 SPEC-2 细胞株中的表达水平较对照组均显著下调(图 4A),DJ-1 mRNA(图 4B)及蛋白(图 4C)表达水平均显著增加;相反,转染 miR-128-2 mimic 后,miR-128-2 表达水平显著上调,DJ-1 mRNA 及蛋白表达水平均显著降低(P 均 < 0.01)。

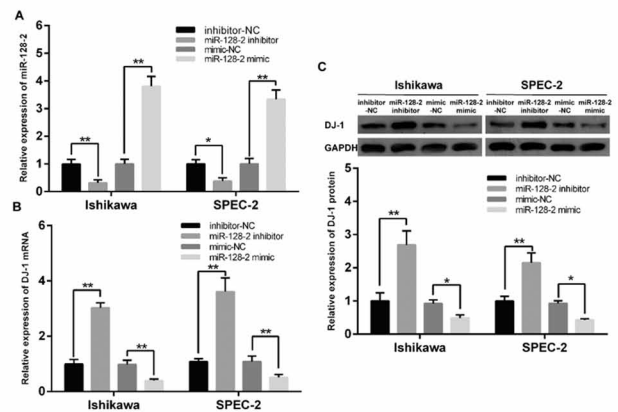


注: ** 表示共转染 wt + mimic 与阴性对照相比, $P < 0.01$, NS 表示差异无统计学意义

图 3 A:miR-128-2 及其野生型(wt)DJ-1 的 3UTR(3'非翻译区)和 DJ-1 的突变体(mut)3UTR 的初步结合位点的示意性结构; B:pGL3-DJ-1-3'UTR-wt 或 pGL3-DJ-1-3'UTR-mut 分别与 miR-128-2 模拟物或模拟 NC(阴性对照)共转染到 Ishikawa 和 SPEC-2 细胞系的验证结果

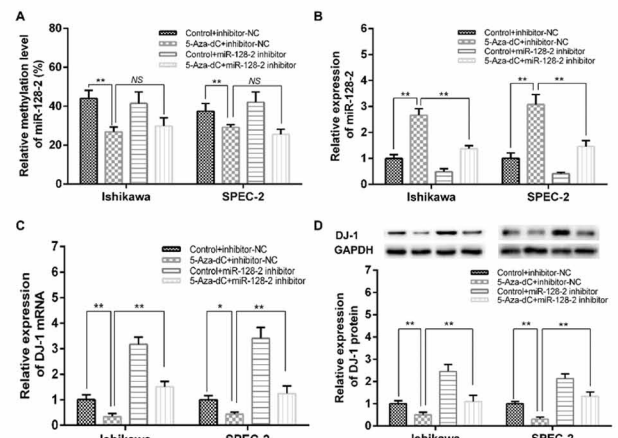
2.4 子宫内膜癌细胞中 DNA 甲基化抑制剂对 miR-128-2 及 DJ-1 表达水平的影响

经 DNA 甲基化抑制剂 5-Aza-dC 处理后,Ishikawa 及 SPEC-2 细胞中 miR-128-2 甲基化水平显著下降(图 5A),但其表达显著上调(图 5B),而 DJ-1 mRNA(图 5C)及蛋白(图 5D)表达显著下调。其中 5-Aza-dC 预处理上调 miR-128-2 表达及下调 DJ-1 表达的作用被 miR-128-2 inhibitor 所逆转(图 5B、C、D),但 5-Aza-dC 预处理抑制 miR-128-2 DNA 甲基化的作用不受 miR-128-2 inhibitor 的影响(图 5A)。



注:与阴性对照比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 4 转染后 Ishikawa 和 SPEC-2 细胞系各组 miR-128-2 和 DJ-1 mRNA 的表达水平、DJ-1 蛋白水平比较



注:与对照相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; NS 表示差异无统计学意义

图 5 预处理后 Ishikawa 和 SPEC-2 细胞系各转染组 miR-128-2-甲基化(A)、miR-128-2 表达(B)和 DJ-1 mRNA(C)和蛋白(D)表达水平

3 讨论

前期研究中^[2]我们在组织水平提供证据间接证实子宫内膜癌中 DJ-1 高表达可能与 miR-128-2 表达沉默有关,而 miR-128-2 表达沉默可能与其基因启动子区高 DNA 甲基化有关^[5]。在此我们进一步对子宫内膜癌中 miR-128-2 基因启动子 DNA 甲基化、miR-128-2 表达以及 DJ-1 表达三者之间的直接上下游调控关系进行了明确。一方面,我们在子宫内膜癌细胞系中发现 miR-128-2 基因启动子区呈 DNA 甲基化增高而其本身处于低表达的状态,同时 DJ-1 处于高表达状态,这与前期组织水平研究所呈现的结果相一致;另一方面,我们的研究提供了直接证据验证 DJ-1 在子宫内膜癌细胞中是 miR-128-2 的一个靶基因。更为重要的是,本研究结果证实 miR-128-2 DNA 甲基化致其表达沉默是 DJ-1 在子宫内膜癌细胞中上调表达的一个重要的分子调控机制。

目前,miRNA 所调控的直接靶基因的验证明确主要涉及两种方法^[6]:一是生物信息学预测结合双荧光素酶(萤火虫荧光素酶、海肾荧光素酶)报告基因检测实验;

二是功能缺失 (loss of function) 及功能获得 (gain of function) 实验。miRNA 的靶基因一般认为应满足下列条件^[6-7]: ① 靶基因与相关 miRNA 的表达水平应表现为负相关性; ② 靶基因 mRNA 的 3'端非编码区(3'UTR)存在 miRNA 种子区的结合位点, 具备直接与 miRNA 结合的能力; 当 miRNA 的表达量出现变化时, 含有靶基因的 mRNA 3'UTR 在荧光素酶报告基因检测实验中能表现出相应改变; ③ 当片段缺失或基因突变等事件出现在 miRNA 靶基因的 mRNA 3'UTR 特定结合位点时, miRNA 抑制靶基因表达的作用将无法发挥。

本研究根据上述标准对子宫内膜癌细胞中 DJ-1 是否为 miR-128-2 的靶基因进行了实验论证。我们首先运用生物信息学分析工具 TargetScanHuman 7.1 对 miR-128-2 在 DJ-1 mRNA 3'UTR 上可能的作用靶点进行生物学预测, 分析表明: 在 DJ-1 mRNA 3'UTR 区确实存在与 miR-128-2 特异性结合的位点, 提示 DJ-1 有可能是 miR-128-2 的靶基因。随后, 我们将该 3'UTR 区的结合位点进行突变, 通过双荧光素酶报告基因检测实验观察了 miR-128-2 对 DJ-1 3'UTR 突变前后荧光素酶活性的影响。结果显示: 转染 miR-128-2 mimic 可使含野生型 DJ-1 3'UTR 报告基因的荧光素酶活性被抑制, 而对含突变型 DJ-1 3'UTR 报告基因的荧光素酶活性则无法产生作用, 表明在子宫内膜癌细胞内 miR-128-2 可特异性与 DJ-1 3'UTR 的特定位点结合。在明确了 miR-128-2 可与 DJ-1 的 3'UTR 特异性结合后, 我们进一步观察了在子宫内膜癌细胞中 miR-128-2 是否能直接靶向调控 DJ-1 的表达。我们分别转染 miR-128-2 inhibitor 和 miR-128-2 mimic 到 Ishikawa 和 SPEC-2 子宫内膜癌细胞株中, 同时设对应的阴性对照组, 通过 qRT-PCR 检测 miR-128-2 及 DJ-1 mRNA 的表达水平的关联变化, 同时通过 WB 检测 DJ-1 蛋白的水平变化。结果显示, miR-128-2 inhibitor 转染可使子宫内膜癌细胞中 miR-128-2 的表达水平大幅降低, 而使 DJ-1 mRNA 及蛋白的表达量显著升高; 相反, miR-128-2 mimic 转染在上调子宫内膜癌细胞中 miR-128-2 表达水平的同时, 能显著抑制 DJ-1 mRNA 及蛋白的表达。上述结果从正反两个方面证实了 miR-128-2 能反向调控 DJ-1 在子宫内膜癌细胞中的表达, 确定 DJ-1 为 miR-128-2 的靶基因。同时, 上述结果再次表明 miR-128-2 表达沉默是子宫内膜癌中 DJ-1 表达异常上调的重要分子调控机制之一。

随后, 我们通过观察 DNA 甲基化抑制剂对子宫内膜癌细胞中 miR-128-2 及 DJ-1 表达水平的影响, 从而进一步确定子宫内膜癌细胞中 miR-128-2 表达沉默是否因其基因启动子区存在高 DNA 甲基化表观遗传调控所致。结果显示, 子宫内膜癌细胞经 5 μ M DNA 甲基化抑制剂 5-Aza-dC 预处理 48 h 后, miR-128-2 DNA 甲基化水平显著降低, 而同时 miR-128-2 表达水平明显增高, 结果表明启动子区 DNA 的甲基化状态与 miR-128-2 的表达程度表现出明显的负相关性, 换言之即 miR-128-2 分子

的表达可由启动子区的 DNA 甲基化修饰来进行反向调控。因此, 我们可以推断出: 在子宫内膜癌细胞中, miR-128-2 分子表达的下调状态或许是由于其基因启动子区发生高 DNA 甲基化表观遗传调控所致。此外, 我们还发现 5-Aza-dC 预处理可导致 DJ-1 mRNA 及蛋白表达量显著降低。有趣的是, 5-Aza-dC 预处理上调 miR-128-2 表达及下调 DJ-1 表达的作用均可被 miR-128-2 inhibitor 转染所逆转, 但 5-Aza-dC 预处理抑制 miR-128-2 DNA 甲基化的作用却不受 miR-128-2 inhibitor 转染所影响。上述结果在细胞水平上表明子宫内膜癌细胞中 miR-128-2 的基因启动子区 DNA 甲基化是致其表达沉默, 从而使 DJ-1 表达上调的重要表观遗传调控机制。

4 结论与展望

综上所述, 子宫内膜癌细胞中 DJ-1 的表达可由 miR-128-2 直接靶向负调控; miR-128-2 基因启动子区 DNA 甲基化致 miR-128-2 表达沉默可能是调控子宫内膜癌细胞中上调 DJ-1 表达的关键机制。本研究在细胞水平, 提供明确证据证实 DJ-1 在子宫内膜癌细胞中上调表达的分子机制至少部分与 miR-128-2 基因启动子区 DNA 甲基化致其表达沉默有关, 但未来还需要在动物整体水平的层面去进一步验证。本研究不仅为进一步探明 DJ-1 在子宫内膜癌细胞中上调表达的分子调控机制增添了新的内容, 同时也为子宫内膜癌的临床精准防治发掘新的靶标和方向打下了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

【参考文献】

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69 (1): 7-34.
- [2] 朱其舟, 舒宽勇, 陈和平, 等. 子宫内膜癌组织中 miR-128-2 基因启动子 DNA 甲基化水平与 miR-128-2、DJ-1 表达及临床病理因素相关性的研究 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2021, 13 (11): 52-59.
- [3] Zhu QZ, Liu HY, Zhao XY, et al. DJ-1 activates the noncanonical NF- κ B pathway via interaction with Cezanne to inhibit the apoptosis and promote the proliferation of Ishikawa cells [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48 (8): 6075-6083.
- [4] Shu K, Xiao Z, Long S, et al. Expression of DJ-1 in endometrial cancer: close correlation with clinicopathological features and apoptosis [J]. Int J Gynecol Cancer, 2013, 23 (6): 1029-1035.
- [5] Li M, Fu W, Wo L, et al. miR-128 and its target genes in tumorigenesis and metastasis [J]. Exp Cell Res, 2013, 319 (20): 3059-3064.
- [6] Xia W, Cao G, Shao N. Progress in miRNA target prediction and identification [J]. Sci China C Life Sci, 2009, 52 (12): 1123-1130.
- [7] Oulas A, Karathanasis N, Louloupis A, et al. Prediction of miRNA targets [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1269: 207-229.

(收稿日期: 2023-09-20 编辑: 陈郢霖)