

# Hsa-miR-5195-3p 对人宫颈癌细胞 SiHa 增殖、迁移与侵袭的影响\*

唐敏 万群 孙恃雷 胡静 孙子久 方玉婷 张彦\*\*

(重庆医科大学检验医学院 临床检验诊断学教育部重点实验室 重庆 400016)

**摘要** 目的:探讨 miR-5195-3p 对人宫颈癌细胞系 SiHa 增殖、迁移与侵袭的影响。方法:采用 qRT-PCR 检测人宫颈癌细胞 SiHa 和正常上皮细胞 HaCaT 中 miR-5195-3p 的表达水平。将 miR-5195-3p mimic 转染至 SiHa 细胞中构建外源性过表达细胞株,阴性对照组中则转染 NC mimic,并用 qRT-PCR 验证转染效率;通过 MTT 和集落形成实验检测细胞增殖能力;划痕愈合实验检测细胞横向迁移能力;Transwell 小室实验检测细胞纵向迁移能力和侵袭能力;采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin 与 snail mRNA 转录水平及蛋白表达水平。结果:宫颈癌细胞 SiHa 中的 miR-5195-3p 表达水平较 HaCaT 偏低( $P < 0.05$ )。与阴性对照组相比,转染 miR-5195-3p mimic 的 SiHa 细胞中 miR-5195-3p 水平显著增高( $P < 0.01$ );并且其体外增殖( $P < 0.001$ ),迁移( $P < 0.001$ )与侵袭能力( $P < 0.001$ )明显减弱;同时 E-cadherin 表达水平上调而 Vimentin、snail 表达水平下调。结论:过表达 miR-5195-3p 可能通过阻碍 EMT 通路抑制宫颈癌细胞 SiHa 的增殖、迁移与侵袭。

**关键词** 宫颈癌 miR-5195-3p 增殖 迁移 侵袭

**中图分类号** Q291

宫颈癌是最常见的生殖系统恶性肿瘤之一,近 90% 发生在发展中国家,并逐年呈年轻化趋势<sup>[1]</sup>。宫颈癌的病死率在中国逐渐呈上升趋势,五年生存率随着病理分级增大逐渐降低,其严重威胁广大妇女的健康和生活质量。宫颈癌的发生发展是一个多阶段、多基因参与的过程,研究宫颈癌发生发展的过程及分子机制对其诊断和治疗仍然具有重要意义<sup>[2]</sup>。随着对宫颈癌研究的深入,研究发现越来越多的微小 RNA (microRNA,简称 miRNA)在宫颈癌细胞中表达存在异常<sup>[3-5]</sup>,说明 miRNA 可能参与调控宫颈癌发生发展等过程。因此探索 miRNA 在癌组织中的表达差异及与宫颈癌的关系,对于提高宫颈癌的诊断和治疗以及改善预后具有重要意义。

miRNA 是一类由 19 ~ 25 个核苷酸组成的小分子

非编码 RNA,其可与靶基因 mRNA 3'非翻译区特异性结合,调节基因的转录和表达,参与调控细胞分化、增殖、凋亡等生物学过程,在肿瘤发生发展中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。miR-5195-3p 是一个近年新发现的 miRNA,对它的研究主要集中在三阴性乳腺癌,卵巢癌,结肠癌等<sup>[7-9]</sup>肿瘤中,其中乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤,卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,而宫颈癌的发病率仅次于乳腺癌,在女性生殖系统恶性肿瘤中则是高居第一位,但目前 miR-5195-3p 与宫颈癌的关系尚不清楚,国内外也未见研究报道,探讨其与宫颈癌的关系或许会为宫颈癌发生发展的分子机制和后续个体化治疗提供理论基础。因此本课题的主要目的是研究在宫颈癌细胞系 SiHa 中,miR-5195-3p 对宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响,以及初步探讨其作用机制。

收稿日期:2019-09-16 修回日期:2019-10-24

\* 国家自然科学基金(81172017、81974449)资助项目

\*\*通讯作者,电子信箱:zy2753@hotmail.com

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

人宫颈癌细胞 SiHa 和人正常上皮细胞 HaCaT 由重庆医科大学检验医学院保存,DMEM 高糖培养基购于美国 HyClone 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibco 公司;Transwell 小室购于康宁公司;TRIZOL 试剂, Lipofectamine™ 2000 转染试剂购于 Invitrogen 公司;逆转录及 PCR 相关试剂购于 TaKaRa 公司;Western blot 及蛋白质提取相关试剂均购自上海碧云天生物技术公司;ECL 发光液购于 Millipore 公司;兔抗人 Vimentin, Snail 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,鼠抗人  $\beta$ -actin 抗体购自南京钟鼎生物技术有限公司;兔抗人 E-cadherin 购于 Immunoway 公司;二抗(山羊抗兔 IgG /HRP 标记,山羊抗鼠 IgG/HRP 标记)购自北京义翘神州生物技术有限公司;Q-PCR 引物由金斯瑞生物科技有限公司合成;miR-5195-3p mimics 和 NC 购自上海吉玛制药技术有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养 宫颈癌细胞 SiHa 和正常上皮细胞

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Name	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')
miR-5195-3p	GCGCGATCCAGTTCTCTGAG	AGTGCAGGTCGCCAGGTATT
U6	AGAGAAGATTAGCATGGCCCTG	AGTGCAGGTCGCCAGGTATT
Vimentin	CTCTGGCAGCTCTTGACCTT	ACCATCTTCTGCCTCTCTGC
E-cadherin	TCATGAGTGTCCCCCGGTAT	TCTTGAAGCGATTGCCCCAT
Snail	GAGGACAGTGGGAAAGGCTC	TGGCTTCGGATGTGCATCTT
GAPDH	GATTGGTCTGATGGGCGC	TCCCCGTTCTCAGCCTTGAC

1.2.4 Western blot 检测 EMT 通路相关蛋白的表达水平 收集对照组、实验组处理 48h 后的 SiHa 细胞,提取细胞总蛋白质,BCA 法检测蛋白质浓度,取 35 $\mu$ g 蛋白质经 10% 的 SDS-PAGE 分离,恒流(210mA)转移分离后的蛋白质至 PVDF 膜上;5% BSA 37℃ 封闭 2h 后,4℃ 下分别加入一抗过夜孵育(E-cadherin/Vimentin / Snail /  $\beta$ -actin 1:1 000 稀释);TBST 洗去游离抗体,分别加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5 000 稀释)或 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5 000 稀释),37℃ 孵育 1h;1  $\times$  TBST 洗膜 10min  $\times$  3,HRP 化学发光液显色。

1.2.5 集落生成实验 将转染 24h 后的 SiHa 细胞接种至六孔板( $1 \times 10^3$  个/孔),培养 8 d 后,使用 4% 多聚

HaCaT 用 DMEM 高糖培养基(含 100ml /L FBS、1 000U/ml 氨苄青霉素、100mg/ml 卡那链霉素)在 37℃、50ml/L 二氧化碳的孵箱中静置培养。每 2 天用胰酶消化传代。取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 细胞转染及分组 将培养至对数期的宫颈癌细胞 SiHa,消化接种于 6 孔细胞板( $1 \times 10^6$  个/孔),待融合度至 80%,更换无血清 DMEM 培养基, Lipofectamine™ 2000 法转染,按照试剂盒说明书操作,实验分两组:① miR-5195-3p 阴性对照组(negative control, NC);② miR-5195-3p 过表达组(5195-3p)。转染后 4 ~ 6 h,观察细胞形态,更换为含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基培养。24 ~ 48h 后收集细胞进行后续实验。

1.2.3 实时定量 PCR 检测 miR-5195-3p 过表达 Trizol 试剂法分别提取各组细胞的总 RNA,取 1 $\mu$ g RNA 逆转录成 cDNA,运用 qRT-PCR 检测并分析 miR-5195-3p、U6、E-cadherin、Snail、Vimentin 和 GAPDH 的 mRNA 表达水平,其中 U6、GAPDH 作为内参对照。

甲醛固定细胞并用结晶紫染液使细胞着色,观察集落生成情况。

1.2.6 MTT 实验 将转染 24h 后的 SiHa 细胞接种至 96 孔板( $3.0 \times 10^3$  个/孔),培养 0、24、48、72、96h 后,加入 MTT 试剂,按照说明书操作,酶标仪检测 490nm 下各孔细胞光密度(optic density, OD), cell viability ratio =  $\frac{OD_{5195-3p} - OD_{blank}}{OD_{NC} - OD_{blank}}$ ,绘制细胞活力率图。

1.2.7 划痕愈合实验 将 SiHa 细胞按  $5.0 \times 10^5$  /孔的密度接种于 6 孔板,12h 后分别转染 NC 与 5195-3p mimic,转染后 6h 或融合度达 95% 以上时,使用 10 $\mu$ l 小枪头在 6 孔板中间划线,PBS 冲洗后,加入 2ml 双无培养基并拍照划痕,此时记为 0h。16h 和 32h 后在各组细

胞相同位置拍照,后使用 AdobeIllustrator 软件计算 0h 与 16h、32h 各组之间距离,根据公式:0h 距离-16h 距离/0h 距离和 0h 距离-32h 距离/0h 距离计算平均划痕愈合率。

**1.2.8 Transwell 小室实验** Transwell 小室实验分为迁移实验与侵袭实验,迁移实验只需直接将细胞悬液加入小室上层;侵袭实验需先在小室上层铺基质胶(每孔 40 $\mu$ l),将小室平稳放置在 37 $^{\circ}$ C 孵箱 1h,进行下一步实验。胰蛋白酶消化转染 24h 后的各组细胞,双无培养基重悬制备细胞悬液,计数制成细胞密度  $4 \times 10^4$  个/ml 和  $6 \times 10^4$  个/ml 的单细胞悬液,在未铺胶小室上层添加细胞密度  $4 \times 10^4$  个/ml 的单细胞悬液 200 $\mu$ l,在铺胶小室上层添加细胞密度  $6 \times 10^4$  个/ml 的细胞悬液 200 $\mu$ l,下室添加 600 $\mu$ l 含 20% 胎牛血清的培养基。迁移实验 24h 后将小室取出,侵袭实验 48h 后将小室取出,PBS 冲洗两次,用 4% 的多聚甲醛固定下层细胞,0.05% 结晶紫染色后,PBS 冲洗两次,用棉签将小室上层细胞轻轻擦拭下去,干燥后在倒置显微镜下对小室下层细胞拍照计数。

**1.2.9 统计分析** 每组实验重复三次,使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。两组间数据比较采用 Student's t 检验,以  $P < 0.05$  为具有统计学差异。

## 2 结 果

### 2.1 miR-5195-3p 在人宫颈癌细胞 SiHa 中的表达

qRT-PCR 结果显示,与人正常上皮细胞 HaCaT 相比,宫颈癌细胞 SiHa 中的 miR-5195-3p 表达水平明显较低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

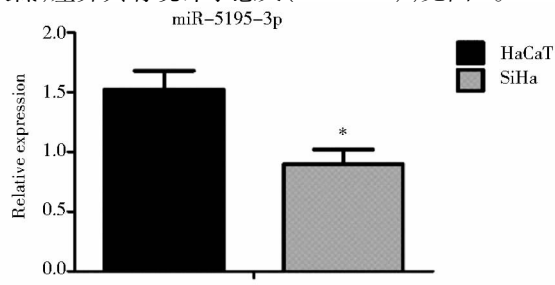


图 1 miR-5195-3p 在正常上皮细胞 HaCaT 与宫颈癌细胞 SiHa 中的表达

Fig. 1 The expression of miR-5195-3p in normal epithelial cell HaCaT and cervical cancer cell SiHa

The expression of miR-5195-3p in HaCaT cells and SiHa cells was detected by qRT-PCR, \* $P < 0.05$  (HaCaT vs SiHa)

### 2.2 过表达 miR-5195-3p 抑制宫颈癌细胞 SiHa 增殖

qRT-PCR 结果显示,与对照组相比,过表达 miR-5195-3p 组宫颈癌细胞 SiHa 的 miR-5195-3p 水平明显升高,且差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 2(a)。以上结果证明,miR-5195-3p mimic 成功实现了 miR-5195-3p 在 SiHa 细胞内的过表达。细胞集落形成实验显示,与对照组相比,过表达 miR-5195-3p 组宫颈癌细胞 SiHa 集落形成能力明显减弱( $P < 0.01$ ),见图 2(b);MTT 实验显示,与 NC 组比较,过表达 miR-5195-3p 组能抑制宫颈癌细胞 SiHa 的增殖能力,差异具有统计学意义( $P < 0.001$ ),见图 2(c)。

### 2.3 过表达 miR-5195-3p 抑制宫颈癌细胞 SiHa 的迁移

划痕愈合实验显示,过表达 miR-5195-3p 的 SiHa 细胞 16h 和 32h 划痕愈合率较对照组有较大降低( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ,图 3a);Transwell 小室实验显示,与对照组相比,过表达 miR-5195-3p 组 SiHa 细胞穿膜细胞数目明显较少( $P < 0.001$ ,图 3b),以上两种实验表明 miR-5195-3p 可以抑制宫颈癌 SiHa 细胞的横向和纵向迁移能力。

### 2.4 过表达 miR-5195-3p 抑制宫颈癌细胞 SiHa 的侵袭

Transwell 侵袭实验中,与对照组相比,过表达 miR-5195-3p 组 SiHa 细胞穿膜细胞数目明显较少,两组间比较具有显著的统计学差异( $P < 0.001$ )。以上结果显示,过表达 miR-5195-3p 可以抑制宫颈癌细胞 SiHa 的侵袭能力(图 4)。

### 2.5 过表达 miR-5195-3p 降低宫颈癌细胞 SiHa 的 EMT 程度

qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,过表达 miR-5195-3p 后 SiHa 细胞内促 EMT 相关标志物 Vimentin、Snail 的 mRNA 及蛋白质水平明显降低,而上皮细胞的标志物 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白质水平则显著增加。上述结果提示 miR-5195-3p 降低宫颈癌细胞 SiHa 的 EMT 程度,其可能是通过抑制 EMT 通路抑制宫颈癌细胞 SiHa 的增殖、迁移与侵袭(图 5)。

## 3 讨 论

宫颈癌是最常见的女性生殖系统恶性肿瘤,其发病年龄日趋年轻化,严重威胁女性健康与生命。目前,国内外宫颈癌的发病率和死亡率仍居高不下,而发展中国家尤为严重,其原因大多与宫颈癌诊断较晚和远端转移有关<sup>[10]</sup>。因此,对宫颈癌发生发展及转移机制的研究显得尤为重要。

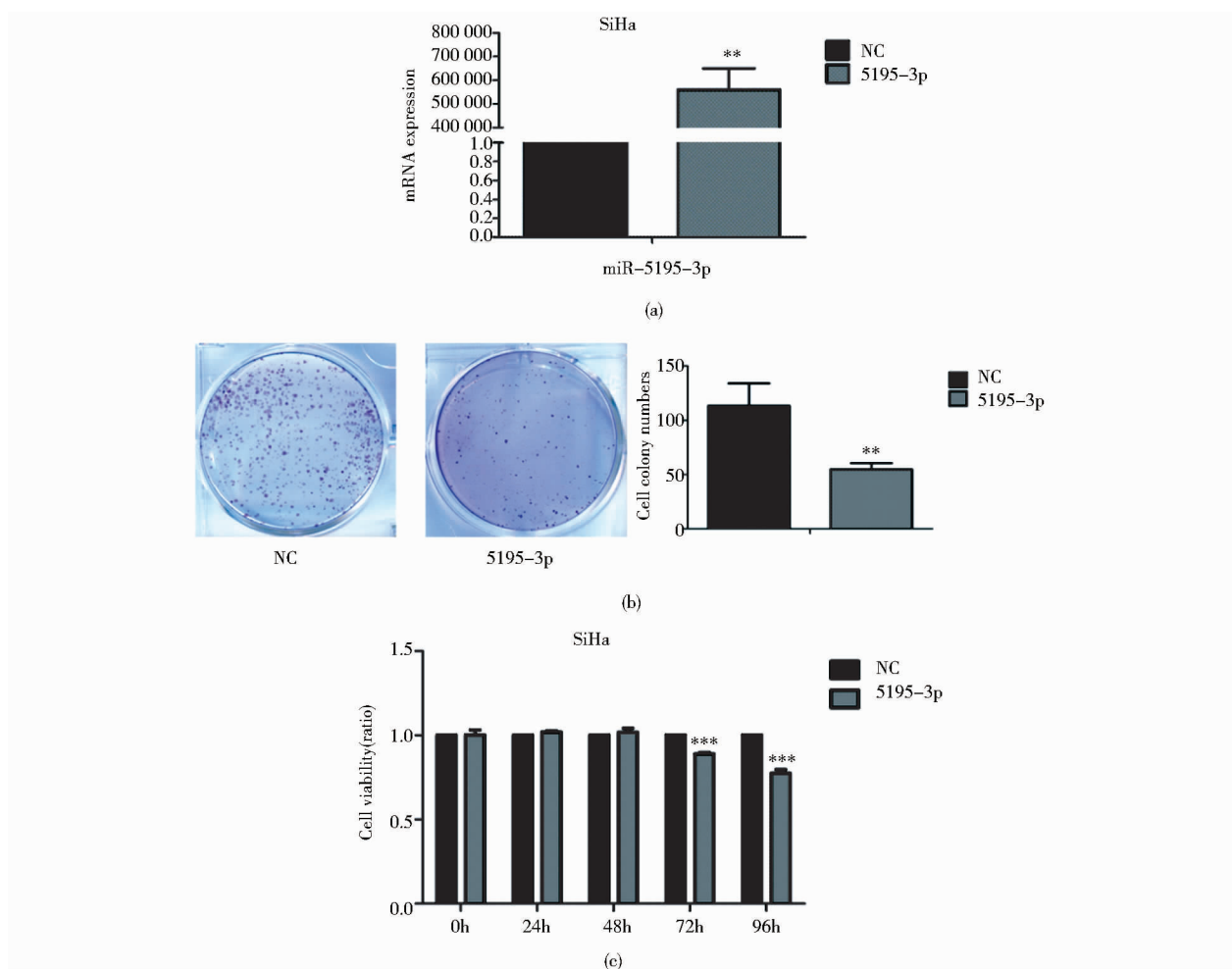


图2 miR-5195-3p 促进宫颈癌细胞 SiHa 的增殖

Fig.2 miR-5195-3p promoted the proliferation of SiHa cells

(a) The expression of miR-5195-3p in SiHa cells was detected by qRT-PCR (b) The SiHa cells proliferation were determined by colony forming test (c) The SiHa cells viability were determined by MTT test \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (NC vs 5195-3p)

宫颈癌发生发展的整个过程几乎都存在 miRNA 的异常表达,尤其是在宫颈癌的发病机制、放化疗敏感性以及预后方面,miRNA 都起着非常重要的作用<sup>[11-12]</sup>。miRNA 作为重要的基因调控分子,近年来其与肿瘤的关系已成为生物学领域的研究热点。许多文献报道了 miRNA 在肿瘤发生发展中的作用。Zhao 等<sup>[13]</sup>研究发现相较于正常组织,miR-143 低表达于宫颈癌组织,且发现过表达 miR-143 可明显抑制宫颈癌细胞的增殖并促进其凋亡。Zhang 等<sup>[14]</sup>研究发现 miR-137 在宫颈癌中低表达,通过过表达 miR-137 发现可明显抑制宫颈癌细胞的增殖和迁移,且进一步研究证实 miR-137 通过靶向 EZH2 抑制宫颈癌的发生发展。Li 等<sup>[15]</sup>在宫颈癌细胞系中证实 miRNA-106a 表达显著上调,通过过表达

miRNA-106a 可明显促进宫颈癌细胞的迁移和侵袭,而抑制 miRNA-106a 的活性则可显著抑制癌细胞的迁移与侵袭。以上研究表明 miRNA 在肿瘤发生发展过程中扮演抑癌或致癌因子的角色,可能作为生物标志物或治疗靶点应用于临床治疗。

miR-5195-3p 是近年新发现的一个 miRNA,目前关于 miR-5195-3p 的研究报道较少,主要集中在肿瘤方面。研究报道,miR-5195-3p 在卵巢癌中扮演一个抑癌因子的角色,其在癌组织中呈现出低表达的情况,且随着病理分级的增大,其表达越发降低,与原位癌组织相比,转移癌组织中的 miR-5195-3p 也是明显降低的<sup>[7]</sup>。在三阴性乳腺癌中,miR-5195-3p 低表达于紫杉醇耐药的乳腺癌组织和细胞系,其可能的机制则是通过靶向

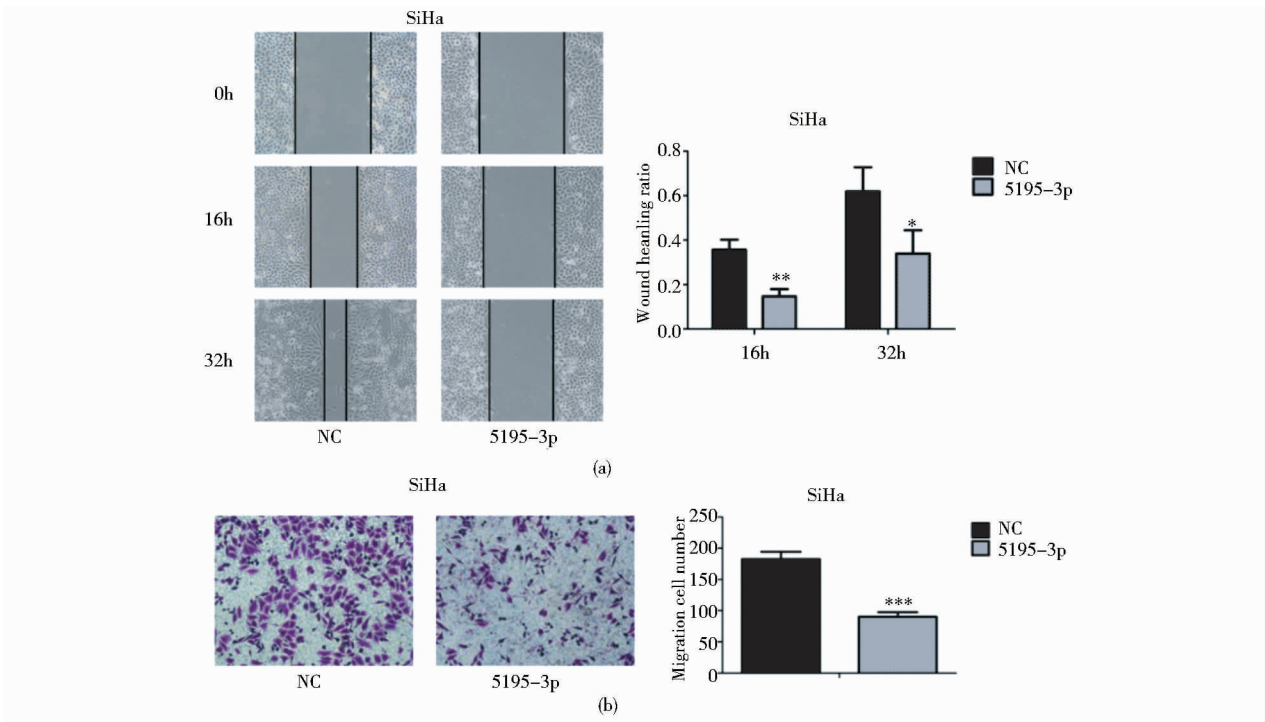


图 3 miR-5195-3p 促进宫颈癌细胞 SiHa 的迁移

Fig.3 miR-5195-3p promoted the migration of SiHa cells

(a),(b) The SiHa cells migration were determined by wound healing test and transwell migration assay  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (NC vs 5195-3p)

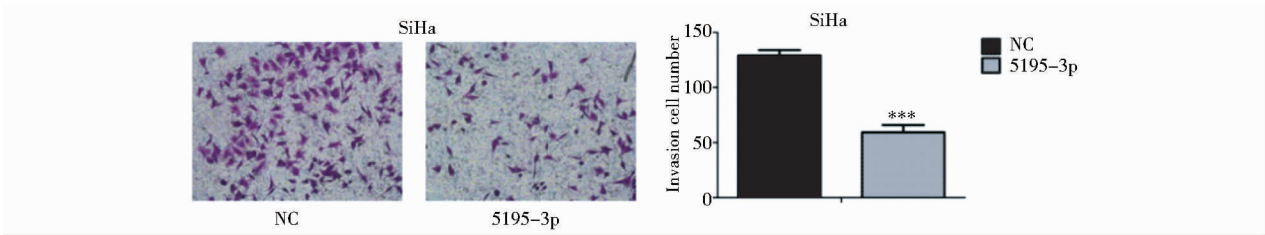


图 4 miR-5195-3p 促进宫颈癌细胞 SiHa 的侵袭

Fig.4 miR-5195-3p promoted the invasion of SiHa cells

The SiHa cells migration were determined by transwell invasion assay, \*\*\* $P < 0.001$  (NC vs 5195-3p)

下调 EIF4A2 增强三阴性乳腺癌对紫杉醇的化疗敏感性<sup>[8]</sup>。在结肠癌中,miR-5195-3p 则通过负性调控 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路发挥其抑制肿瘤的作用<sup>[9]</sup>。研究表明 miR-5195-3p 在膀胱癌组织中低表达,其通过直接靶向致癌基因 KLF5 抑制膀胱癌细胞的增殖和侵袭<sup>[16]</sup>。在非小细胞肺癌中,miR-5195-3p 通过抑制 MYO6 的表达进而发挥其抑制肿瘤细胞增殖,迁移和侵袭的作用<sup>[17]</sup>。文献报道在胶质瘤中,miR-5195-3p 通过靶向 Beclin1 抑制肿瘤细胞的凋亡和自噬<sup>[18]</sup>。宫颈癌是女性恶性肿瘤发病率仅次于乳腺癌的肿瘤,且其在女性

生殖器官恶性肿瘤中发病率高于卵巢癌位居第一,miR-5195-3p 在上述癌症中多与转移侵袭相关,而宫颈癌治疗失败的主要原因则是转移与复发,目前 miR-5195-3p 与宫颈癌的关系尚属未知,因此研究 miR-5195-3p 在宫颈癌中发挥的作用及其分子机制,或许会为宫颈癌的治疗带来新的理论基础。

本研究选择在恶性程度较低,转移侵袭能力较差的宫颈癌细胞 SiHa 内过表达 miR-5195-3p。集落形成实验证明,过表达 miR-5195-3p 能抑制宫颈癌细胞的增殖能力。划痕实验表明,过表达 miR-5195-3p 后能抑制

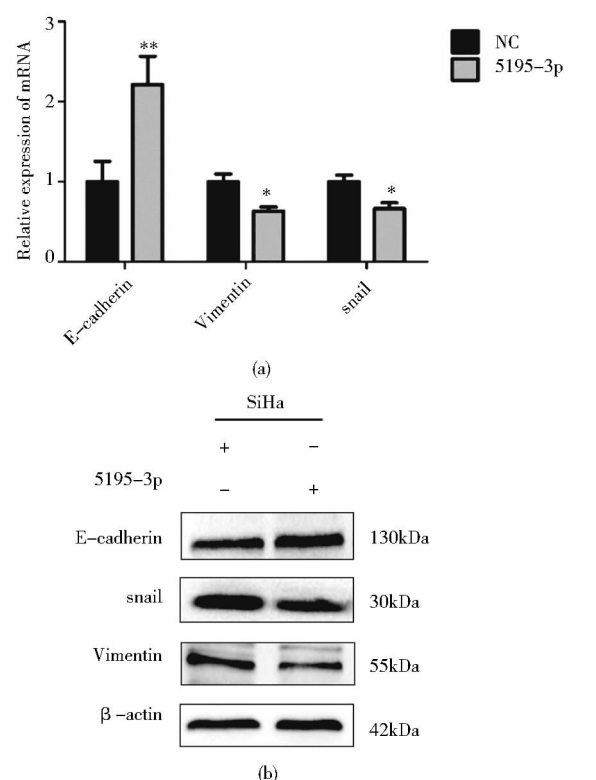


图5 miR-5195-3p 激活 SiHa 细胞的 EMT 信号通路

Fig. 5 miR-5195-3p activated the EMT signaling pathway of SiHa cells

(a) The expression of EMT mRNA were detected by qRT-PCR

(b) The expression of EMT protein were detected by Western blot

\* $P < 0.05$  (NC vs 5105-3p) ; \*\* $P < 0.01$  (NC vs 5105-3p)

宫颈癌细胞的横向迁移能力。Transwell 结果显示,实验组细胞的纵向迁移能力及侵袭能力明显降低。以上结果提示过表达 miR-5195-3p 可抑制宫颈癌细胞 SiHa 的增殖,迁移和侵袭能力。

miRNA 作为调控基因表达的重要分子,其可参与调控多条信号通路<sup>[19]</sup>。研究表明,许多 miRNA 在调节 EMT 过程中起着关键作用<sup>[20-21]</sup>。EMT 在癌症进展,胚胎发生及干细胞生物学中均发挥重要作用<sup>[22]</sup>。EMT 过程中,上皮非迁移细胞再分化为间充质样迁移细胞,导致恶性肿瘤细胞向继发部位浸润。我们研究发现,在宫颈癌细胞系 SiHa 中过表达 miR-5195-3p 后,与肿瘤转移相关因子 snail 和 Vimentin 的 mRNA 及蛋白相对表达量下调,与抑制肿瘤转移的 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白相对表达量增加,这表明 miR-5195-3p 通过影响 EMT 相关因子(E-cadherin, snail 和 Vimentin)的表达从而抑制 EMT 相关通路进而抑制宫颈癌细胞系 SiHa 的

迁移与侵袭能力。

综上所述,本课题通过在人宫颈癌细胞 SiHa 内过表达 miR-5195-3p,证实 miR-5195-3p 可以抑制 SiHa 细胞的增殖、迁移与侵袭能力,且该抑制作用可能是通过抑制 EMT 相关通路实现的。通过数据库 TargetScan Human 7.2, starBase V3.0 以及 miRTar Base 对 miR-5195-3p 进行分析,我们发现其靶基因中,CDK6, ZFYVE9, CTNNBIP1 是与细胞周期, SMAD 通路, EMT 相关的分子。CDK6 是周期蛋白依赖性激酶 6, 可与 cyclin D1 结合形成复合物调节细胞,周期的进程; ZFYVE9 基因编码的蛋白则参与了 TGF- $\beta$ /SMAD 信号通路; CTNNBIP1 是  $\beta$ -catenin 的抑制因子,最初发现其发挥抑制 WNT 信号通路的作用<sup>[23-24]</sup>,而在宫颈癌中,其通过破坏 E-cadherin/ $\beta$ -catenin 复合物形成促进 EMT 进程<sup>[25]</sup>。通过对一些靶基因的分析,提示 miR-5195-3p 可能通过调控这些靶基因来发挥相应抑制肿瘤的作用。接下来我们将进一步研究 miR-5195-3p 在宫颈癌细胞 SiHa 侵袭转移中的分子机制,为下一步研究 miR-5195-3p 相关作用靶点提供理论依据。

## 参考文献

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2015, 65 (2): 87-108.
- [2] Jin X W, Lipold L, Foucher J, et al. Cost-effectiveness of primary HPV testing, cytology and co-testing as cervical cancer screening for women above age 30 years. *Journal of General Internal Medicine*, 2016, 31 (11): 1338-1344.
- [3] Xu J, Li Y, Wang F, et al. Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer. *Oncogene*, 2013, 32 (8): 976-987.
- [4] Chen G, Huang P, Xie J, et al. MicroRNA 211 suppresses the growth and metastasis of cervical cancer by directly targeting ZEB1. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 17 (1): 1275-1282.
- [5] Song R, Cong L, Ni G, et al. MicroRNA-195 inhibits the behavior of cervical cancer tumors by directly targeting HDGF. *Oncology Letters*, 2017, 14 (1): 767-775.
- [6] Nair V B, Manasa V G, Sinto M S, et al. Differential expression of microRNAs in uterine cervical cancer and its implications in carcinogenesis; an integrative approach. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2018, 28 (3): 553-562.
- [7] Ebrahimi S O, Reisi S. Downregulation of miR-4443 and miR-5195-3p in ovarian cancer tissue contributes to metastasis and tumorigenesis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2019: 1-6.

- [ 8 ] Liu M, Gong C, Xu R, et al. MicroRNA-5195-3p enhances the chemosensitivity of triple-negative breast cancer to paclitaxel by downregulating EIF4A2. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24: 47.
- [ 9 ] Jahangiri Moez M, Bjeije H, Soltani B M. Hsa-miR-5195-3P induces downregulation of TGF $\beta$ R1, TGF $\beta$ R2, SMAD3 and SMAD4 supporting its tumor suppressive activity in HCT116 cells. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2019, 109:1-7.
- [10] Suprasert P, Charoenkwan K, Siriaree S, et al. Outcome of cervical cancer patients with single-node compared with no nodal involvement treated with radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2013, 121(1):45-48.
- [11] Song R, Cong L, Ni G, et al. MicroRNA-195 inhibits the behavior of cervical cancer tumors by directly targeting HDGF. *Oncology Letters*, 2017,14 (1): 767-775.
- [12] Peralta-Zaragoza O, Deas J, Meneses-Acosta, Angélica, et al. Relevance of miR-21 in regulation of tumor suppressor gene PTEN in human cervical cancer cells. *BMC Cancer*, 2016, 16(1): 215.
- [13] Zhao Y, Liu X, Lu Y X. MicroRNA-143 regulates the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells by targeting HIF-1 $\alpha$ . *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(24):5580-5586.
- [14] Zhang H, Yan T, Liu Z, et al. MicroRNA-137 is negatively associated with clinical outcome and regulates tumor development through EZH2 in cervical cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017,119 (1): 938-947.
- [15] Li X, Zhou Q, Tao L, et al. MicroRNA-106a promotes cell migration and invasion by targeting tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2 in cervical cancer. *Oncology Reports*, 2017, 38(3):1774-1782.
- [16] Jiang Z, Zhang Y, Cao R, et al. miR-5195-3p inhibits proliferation and invasion of human bladder cancer cells by directly targeting oncogene KLF5. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 2017, 25(7): 1081-1087.
- [17] Yang Q. MicroRNA-5195-3p plays a suppressive role in cell proliferation, migration and invasion by targeting MYO6 in human non-small cell lung cancer. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2018:1-9.
- [18] Zhang Z, Tian H, Miao Y, et al. Upregulation of p72 enhances malignant migration and invasion of glioma cells by repressing Beclin1 expression. *Biochemistry (Moscow)*, 2016, 81(6):574-582.
- [19] Aakula A, Kohonen P, Leivonen S K, et al. Systematic identification of microRNAs that impact on proliferation of prostate cancer cells and display changed expression in tumor tissue. *European Urology*, 2016, 69(6):1120-1128.
- [20] Wang R, Yu Z, Chen F, et al. miR-300 regulates the epithelial-mesenchymal transition and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting the FAK/PI3K/AKT signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 103:1632-1642.
- [21] Chang R M, Xu J F, Fang F, et al. MicroRNA-130b promotes proliferation and EMT-induced metastasis via PTEN/p-AKT/HIF-1 $\alpha$  signaling. *Tumor Biology*, 2016, 37(8):10609-10619.
- [22] Amparo C, Antonio D L, Gema M B. Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Management and Research*, 2014, 6: 205-216.
- [23] Tago K I, Nakamura T, Nishita M, et al. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel  $\beta$ -catenin-interacting protein. *Genes & Development*, 2000, 14(14):1741-1749.
- [24] Kailiang Zhang, Shanjun Zhu, Yanwei Liu, et al. ICAT inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin activity. *Cancer Letters*, 2015, 357(1):404-411.
- [25] Jiang Y, Ren W, Wang W, et al. Inhibitor of  $\beta$ -catenin and TCF (ICAT) promotes cervical cancer growth and metastasis by disrupting E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex. *Oncology Reports*, 2017, 38(5):2597-2606.

## The Effects of Hsa-miR-5195-3p on the Proliferation, Migration and Invasion of Human Cervical Cancer SiHa Cells

TANG Min WAN Qun SUN Shi-lei HU Jing SUN Zi-jiu FANG Yu-ting ZHANG Yan

(Key Laboratory of Diagnostic Medicine Designated by the Chinese Ministry of Education,  
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** Objective: To investigate the effect of miR-5195-3p on the proliferation, migration and invasion of human cervical cancer cell line SiHa. Methods: The expression levels of miR-5195-3p in human cervical cancer cells SiHa and normal epithelial cells HaCaT were detected by real-time quantitative PCR. The miR-5195-3p mimic was transfected into SiHa cells to construct exogenous overexpressed cell lines, while the negative control group was transfected with NC mimic and the transfection efficiency was verified by real-time quantitative PCR; MTT and colony formation experiments were utilized to assess the proliferation capacity; The competence of transversal migration was examined by Wound healing experiment; Transwell assay was performed to evaluated the longitudinal migration and invasion ability; The mRNA transcription and protein expression levels of E-cadherin, Vimentin and snail were analyzed by real-time quantitative PCR and Western blot. Results: the expression level of miR-5195-3p in SiHa was lower than HaCaT ( $P < 0.05$ ). Compared with the negative control group, the level of miR-5195-3p in SiHa cell which transfected the miR-5195-3p mimic was significantly increased ( $P < 0.01$ ); Moreover, their proliferation, migration and invasion in vitro were distinctly reduced ( $P < 0.001$ ); Meanwhile, the expression levels of E-cadherin were up-regulated while those of Vimentin and snail were down-regulated. Conclusion: overexpression of miR-5195-3p may inhibit the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cell SiHa by blocking EMT pathway.

**Key words** Cervical Cancer miR-5195-3p Proliferation Migration Invasion