

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.19.003

文章编号: 1005-8982(2018)19-0012-04

miR-106a 对小鼠卵巢癌移植瘤生长的影响研究

蔡智慧¹, 李鹏², 梁义娟¹, 石军荣¹, 苏媛媛¹, 谢丹¹, 刘竞芳³

(1. 河北大学附属医院 妇科, 河北 保定 071030; 2. 河北大学附属医院 超声科, 河北 保定 071030; 3. 河北省保定市第一医院 超声科, 河北 保定 071000)

摘要: **目的** 研究 miR-106a 对小鼠卵巢癌移植瘤生长的影响。**方法** 选择 SPF 级 BALB/c 小鼠作为实验动物, 将 SKOV3 卵巢癌细胞注入小鼠皮下以复制卵巢癌移植瘤模型, 将模型小鼠随机分为空白对照组、阴性对照组、miR-106a 抑制组, 分别用不含抑制剂的转染试剂、含阴性对照抑制剂的转染试剂、含 miR-106a 抑制剂的转染试剂进行干预, 干预前及干预后分别测定移植瘤体积以及移植瘤中 PTEN 信号通路分子的表达量。**结果** 干预后 10、20、30 和 40 d 时, 空白对照组、阴性对照组、miR-106a 抑制组之间瘤体体积的比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 每组内不同时间点的比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 组间与时间变化趋势的比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 干预后 40 d 时, miR-106a 抑制组小鼠肿瘤组织中 PTEN 的 mRNA 表达高于空白对照组和阴性对照组, PI3K、AKT、CyclinD1、Survivin、MMP-2、MMP-9、VEGF 的 mRNA 表达低于空白对照组和阴性对照组。**结论** miR-106a 对小鼠卵巢癌移植瘤的生长具有抑制作用, 增强 PTEN 信号通路是 miR-106a 抑制肿瘤生长的分子机制。

关键词: 卵巢癌; miR-106a; PTEN; 增殖; 侵袭; 血管新生

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Effect of intratumoral injection of miR-106a inhibitor on tumor growth of ovarian cancer xenografts in mice

Zhi-hui Cai¹, Peng Li², Yi-juan Liang¹, Jun-rong Shi¹, Yuan-yuan Su¹, Dan Xie¹, Jing-fang Liu³

(1. Department of Gynecology, 2. Department of Ultrasonography, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071030, China; 3. Department of Ultrasonography, Baoding No.1 Hospital, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: Objective To study the effect of intratumoral injection of miR-106a inhibitor on tumor growth of ovarian cancer xenografts in mice. **Methods** SPF BALB/c mice were selected as the experimental animal, then ovarian cancer xenograft model was made by injection of ovarian cancer SKOV3 cells into nude mice. The model mice were randomly divided into a blank control group, a negative control group and a miR-106 inhibition group, intervened respectively by transfection of reagent containing no inhibitor, transfection of reagent containing negative control inhibitors and transfection of reagent containing miR-106a inhibitor. Before and after intervention, the xenograft volume and expressions of PTEN signaling molecules in the xenografts were measured. **Results** On the 10th, 20th, 30th and 40th d after intervention, there were significant differences in the tumor volume among the 3 groups ($P < 0.05$), and there were significant differences in the tumor volume at different time points in each group ($P < 0.05$). The change trends of the tumor volume with time had statistical differences among the 3 groups ($P < 0.05$). On the 40th d after intervention, PTEN mRNA expression level of the miR-106a inhibition group was significantly higher than that of the blank control group and the negative control group ($P < 0.05$), while the mRNA expression levels of PI3K, AKT, Cyclin D1, Survivin, MMP-2, MMP-9 and VEGF were significantly lower than

收稿日期: 2017-10-08

[通信作者] 李鹏, E-mail: hdyfipeng@126.com; Tel: 13930865865

those of the blank control group and the negative control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Intratumoral injection of miR-106a inhibitor has inhibitory effect on tumor growth of ovarian cancer xenografts in mice, and the enhancement of PTEN signaling pathway is the molecular mechanism of tumor growth inhibition by miR-106a inhibitor.

Keywords: ovarian cancer; miR-106a; PTEN; proliferation; invasion; angiogenesis

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,患者的复发率和死亡率均较高。卵巢癌细胞增殖、侵袭能力较强,且目前尚缺乏治疗卵巢癌的靶向药物是造成卵巢癌患者预后较差的重要原因。因此,寻找卵巢癌的治疗靶点对改善卵巢癌患者的预后具有积极价值。微小 RNA (MicroRNA, miRNA) 是一类在细胞内发挥多种生物学作用的非编码小分子 RNA,能够调节靶基因的转录和翻译过程并影响细胞的增殖、侵袭及血管新生。miRNA-106a (miR-106a) 是近年来发现的具有原癌基因特性的 miRNA,能够靶向抑制癌细胞内多种抑癌基因的表达。在恶性肿瘤的发生和发展过程中,miR-106a 的高表达会抑制抑癌基因的表达并增强癌细胞的恶性生物学行为^[1]。已有研究报道,miR-106a 对卵巢癌细胞的体外增殖、侵袭具有促进作用^[2],但关于 miR-106a 对癌细胞在体条件下增殖、侵袭的影响并未明确。本研究复制小鼠卵巢癌移植瘤模型并分析瘤内注射 miR-106a 对卵巢癌移植瘤生长的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SKOV3 卵巢癌细胞株购自中国科学院上海细胞库, RPMI 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶均购自上海 Hyclone 公司, Lipofectamine™ 2000 购自上海 Invitrogen 公司, miR-106a 抑制剂、阴性对照的抑制剂由上海吉玛公司合成, SPF 级 BALB/c 小鼠购买自北京维通利华实验动物技术有限公司, RNA 抽提试剂盒、互补 DNA (complementary DNA, cDNA) 第一链合成试剂盒实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 试剂盒购自北京天根生物公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠卵巢癌移植瘤模型的复制 培养 SKOV-3 细胞,用 0.125% 的胰蛋白酶消化传代,取传代后且处于对数生长期的 SKOV-3 细胞,离心后用无血清培养基重悬细胞并调节密度至 1×10^7 个/ml,取 0.5 ml 细胞悬液并进行皮下注射,注射部位为小鼠右前肢腋窝外侧,注射后 7 d 测量肿瘤体积,以肿瘤体积 $3 \sim 4 \text{ mm}^3$ 判断为模型复制成功,用于后续分组和实验。

1.2.2 卵巢癌移植瘤小鼠的分组和干预 取卵巢癌移植瘤小鼠,随机分为空白对照组、阴性对照组、miR-106a 抑制组,每组各 8 只,干预方法:①空白对照组:瘤内注射 100 μl 生理盐水与 3 μl Lipofectamine™ 2000 试剂的混合液;②阴性对照组:瘤内注射 95 μl 生理盐水、5 μl 阴性对照抑制剂、3 μl Lipofectamine™ 2000 试剂的混合液;③ miR-106a 抑制组:瘤内注射 95 μl 生理盐水、5 μl miR-106 抑制剂、3 μl Lipofectamine™ 2000 试剂的混合液。每隔 4 d 注射 1 次,并用游标卡尺测量肿瘤的最大长径和最大横径,以 $0.5 \times$ 最大长径 \times 最大横径 \times 最大横径计算肿瘤体积。

1.2.3 基因 mRNA 表达的检测 干预后第 40 天,测量肿瘤体积后处死小鼠,解剖得到移植瘤组织后采用 RNA 抽提试剂盒分离组织中的总 RNA,而后采用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA;取 cDNA 样本进行 qRT-PCR 扩增,分别扩增人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, PTEN)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/AKT)、细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)、生存素 (Survivin)、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、 β -肌动蛋白 (β -actin),以 β -actin 为内参照计算 PTEN、PI3K、AKT、CyclinD1、Survivin、MMP-2、MMP-9、VEGF 的 mRNA 表达。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,3 组比较采用方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验,多时间的比较采用重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瘤体体积的变化情况

空白对照组、阴性对照组、miR-106a 抑制组干预前、干预后 10、20、30 和 40 d 时瘤体体积比较,

采用重复测量设计的方差分析,结果:①空白对照组、阴性对照组、miR-106a 抑制组之间的瘤体体积有差异 ($F=17.685, P=0.000$); ②每组内不同时间点的瘤体体积有差异 ($F=13.489, P=0.000$); ③各组瘤体体积变化趋势有差异 ($F=16.328, P=0.000$)。见表 1。

2.2 肿瘤组织中 *PTEN*、*PI3K*、*AKT* 的表达

干预后 40 d 时,空白对照组、阴性对照组、miR-106a 抑制组移植瘤小鼠肿瘤组织中 *PTEN*、*PI3K*、*AKT* 表达的分析如下:miR-106a 抑制组小鼠肿瘤组织中 *PTEN* 的 mRNA 表达高于空白对照组和阴性对照

组 ($P<0.05$), *PI3K*、*AKT* 的 mRNA 表达低于空白对照组和阴性对照组 ($P<0.05$)。见表 2。

2.3 肿瘤组织中信号通路下游分子的表达

干预后 40 d 时,空白对照组、阴性对照组、miR-106a 抑制组移植瘤小鼠肿瘤组织中 *CyclinD1*、*Survivin*、*MMP-2*、*MMP-9*、*VEGF* 表达的分析如下:miR-106a 抑制组小鼠肿瘤组织中 *CyclinD1*、*Survivin*、*MMP-2*、*MMP-9*、*VEGF* 的 mRNA 表达低于空白对照组和阴性对照组 ($P<0.05$)。见表 3。

表 1 3 组移植瘤小鼠瘤体体积的变化情况 ($n=8, \text{mm}^3, \bar{x} \pm s$)

组别	干预前	干预后 10 d	干预后 20 d	干预后 30 d	干预后 40 d
miR-106a 抑制组	5.90 ± 0.82	46.97 ± 6.94 ⁽¹⁾²⁾³⁾	92.52 ± 10.25 ⁽¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	135.65 ± 17.85 ⁽¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	188.42 ± 22.46 ⁽¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾
阴性对照组	5.98 ± 0.91	115.14 ± 18.02 ³⁾	227.14 ± 39.24 ⁽³⁾⁴⁾	390.15 ± 45.61 ⁽³⁾⁴⁾	629.14 ± 81.25 ⁽³⁾⁴⁾
空白对照组	5.92 ± 0.78	114.52 ± 16.79 ³⁾	225.96 ± 37.82 ⁽³⁾⁴⁾	387.87 ± 42.62 ⁽³⁾⁴⁾	624.51 ± 78.78 ⁽³⁾⁴⁾

注: 1) 与空白对照组比较, $P<0.05$; 2) 与阴性对照组比较, $P<0.05$; 3) 与干预前比较, $P<0.05$; 4) 与干预后 10 d 比较, $P<0.05$; 5) 与干预后 20 d 比较, $P<0.05$; 6) 与干预后 30 d 比较, $P<0.05$

表 2 3 组移植瘤小鼠肿瘤组织中 *PTEN*、*PI3K*、*AKT* 的表达 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>PTEN</i>	<i>PI3K</i>	<i>AKT</i>
miR-106a 抑制组	2.65 ± 0.39 [†]	0.38 ± 0.09 [†]	0.41 ± 0.08 [†]
阴性对照组	1.05 ± 0.14	1.06 ± 0.17	1.02 ± 0.15
空白对照组	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.18
<i>F</i> 值	23.951	20.285	12.582
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.002

注: † 与阴性对照组和空白对照组比较, $P<0.05$

表 3 3 组移植瘤小鼠肿瘤组织中信号通路下游分子的表达 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>CyclinD1</i>	<i>Survivin</i>	<i>MMP-2</i>	<i>MMP-9</i>	<i>VEGF</i>
miR-106a 抑制组	0.35 ± 0.08 [†]	0.32 ± 0.06 [†]	0.39 ± 0.06 [†]	0.28 ± 0.05 [†]	0.23 ± 0.04 [†]
阴性对照组	0.98 ± 0.14	1.03 ± 0.15	1.05 ± 0.16	1.07 ± 0.12	0.97 ± 0.16
空白对照组	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.15
<i>F</i> 值	18.352	21.348	16.843	28.682	22.155
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: † 与阴性对照组和空白对照组比较, $P<0.05$

3 讨论

卵巢癌的发病机制目前仍未明确,临床上也缺乏治疗卵巢癌的靶向药物。miRNA 是近年来新发现的一类具有广泛生物学活性的非编码小分子 RNA,能够与靶基因 mRNA 的 3'-非翻译区结合并造成 mRNA

降解或抑制 mRNA 翻译。miR-106a 是具有原癌基因活性的 miRNA,已有多项研究发现,miR-106a 在胃癌^[3]、卵巢癌^[4]、胰腺癌^[5]等多种恶性肿瘤组织中呈高表达趋势,且与癌细胞的增殖活力、侵袭活力密切相关。国内李敏等^[2]的研究报道,miR-106a 对卵巢

癌细胞的体外增殖、侵袭具有促进作用,但是关于 miR-106a 对卵巢癌组织生长的影响未见报道。本研究以卵巢癌移植瘤小鼠作为研究对象,通过瘤内注射 miR-106a 的方式来分析卵巢癌组织中 miR-106a 的生物学作用,进而对肿瘤组织的生长情况进行评价,结果显示:干预后 10、20、30 和 40 d 时,miR-106a 抑制组移植瘤小鼠的瘤体体积均低于空白对照组和阴性对照组。这就说明 miR-106a 抑制剂对卵巢癌移植瘤的生长具有抑制作用。

miRNA 发挥生物学作用主要依赖于对靶基因表达的靶向调控,miR-106a 在恶性肿瘤的病情发展变化过程中起到促进作用且对多种促凋亡基因、抑癌基因的表达具有靶向抑制作用。*PTEN* 基因是体内重要的抑癌基因之一,也是受到 miR-106a 调节的靶基因之一^[6-7]。*PTEN* 基因所编码的蛋白能够是细胞内的第二信使 PIP3 脱去 3'-磷酸,进而影响下游 PI3K/AKT 信号通路的激活。在卵巢癌的发生和发展过程中,*PTEN* 的表达减少,低表达的 *PTEN* 会造成 PI3K/AKT 激活并促进细胞的增殖、侵袭及血管新生。通过分析移植瘤组织中 *PTEN*/PI3K/AKT 的表达可知,miR-106a 抑制组小鼠肿瘤组织中 *PTEN* 的 mRNA 表达高于空白对照组和阴性对照组,PI3K、AKT 的 mRNA 表达低于空白对照组和阴性对照组。这就说明 miR-106a 能够靶向调控卵巢癌组织中 *PTEN* 的表达,抑制 miR-106a 能够增加 *PTEN* 的表达并抑制 PI3K/AKT 的激活。

PTEN 所调控的 PI3K/AKT 信号通路具有广泛的生物学效应,细胞的增殖、侵袭、血管新生等生物学过程均受到该信号通路的调控。PI3K 发生磷酸化后能够将底物磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸转变为 PI3P,后者能够使 AKT 发生磷酸化并调节多种增殖、侵袭、血管新生相关靶基因的表达^[8-9]。*CyclinD1* 和 *Survivin* 是受到 AKT 调控的增殖相关基因,前者能够与 CDK4、CDK6 形成复合物并加速细胞周期,后者能够拮抗多种 Caspase 分子并抑制细胞凋亡;MMP-2 和 MMP-9 是 MMPs 家族中受到 AKT 调控的成员,能够通过降解细胞外基质的方式促进细胞侵袭;*VEGF* 是受到 AKT 调控的血管新生血管基因,是目前已知促血管新生作

用最强的细胞因子。本研究通过分析移植瘤组织中上述增殖、侵袭、血管新生相关靶基因的表达量可知:miR-106a 抑制组小鼠肿瘤组织中 *CyclinD1*、*Survivin*、MMP-2、MMP-9、*VEGF* 的 mRNA 表达低于空白对照组和阴性对照组。说明 miR-106a 对卵巢癌组织中 *CyclinD1*、*Survivin*、MMP-2、MMP-9、*VEGF* 的表达具有调节作用,抑制 miR-106a 能够减少增殖、侵袭、血管新生相关靶基因的表达。

综上所述,miR-106a 对卵巢癌组织中 *PTEN*/PI3K/AKT 通路具有靶向调节作用;瘤内注射 miR-106a 抑制剂能够通过增强 *PTEN* 信号通路来抑制卵巢癌移植瘤小鼠的肿瘤生长。

参 考 文 献:

- [1] 熊真. 胃癌组织中 miRNAs 及下游靶基因表达量分析及其与临床病理分期的关系探究[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(8): 732-735.
- [2] 李敏, 张向宁, 魏媛, 等. microRNA-106a 促进上皮性卵巢癌细胞系迁移和侵袭的研究[J]. 现代妇产科进展, 2015, 24(11): 809-813.
- [3] HOU X, ZHANG M, QIAO H. Diagnostic significance of miR-106a in gastric cancer[J]. Int J ClinExpPathol, 2015, 8(10): 13096-13101.
- [4] KOUTSAKI M, SPANDIDOS D A, ZARAVINOS A. Epithelial-mesenchymal transition-associated miRNAs in ovarian carcinoma, with highlight on the miR-200 family: prognostic value and prospective role in ovarian cancer therapeutics[J]. Cancer Lett, 2014, 351(2): 173-181.
- [5] LI P, XU Q, ZHANG D, et al. Upregulated miR-106a plays an oncogenic role in pancreatic cancer[J]. FEBS Lett, 2014, 588(5): 705-712.
- [6] DHAR S, KUMAR A, RIMANDO A M, et al. Resveratrol and pterostilbene epigenetically restore PTEN expression by targeting oncomiRs of the miR-17 family in prostate cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(29): 27214-27226.
- [7] XIE X, LIU H T, MEI J, et al. miR-106a promotes growth and metastasis of non-small cell lung cancer by targeting PTEN[J]. Int J ClinExpPathol, 2015, 8(4): 3827-3834.
- [8] 杨晓荣, 郑洪, 谭娜. PI3K/AKT 信号通路与 *Survivin* 在上皮性卵巢肿瘤中的表达及相关性[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(3): 231-236.
- [9] 梅琳. 阿伐他汀通过 PI3K/AKT/mTOR 调节 HL-60 白血病细胞凋亡的实验研究[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(6): 528-530.

(张西倩 编辑)