

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.10.005

文章编号: 1005-8982(2017)10-0025-05

MicroRNA-101 对上皮性卵巢癌耐药细胞 SKOV3/DDP 顺铂敏感性的影响*

代娟¹, 韩萍¹, 曹燕花², 王秀娟¹, 杨莉¹, 于笑涵³

(1. 华北理工大学附属医院 妇产科, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学公共卫生学院, 河北 唐山 063000;
3. 华北理工大学临床医学院, 河北 唐山 063000)

摘要: **目的** 探讨 MicroRNA-101(miRNA-101)对上皮性卵巢癌耐药细胞 SKOV3/DDP 顺铂敏感性的影响及相关作用机制。 **方法** 本研究通过细胞转染技术上调 SKOV3/DDP 细胞内 miRNA-101 的表达, 采用 RT-PCR 检测 miRNA-101 及 BDNF mRNA 的表达情况; CCK-8 检测 SKOV3/DDP 细胞顺铂敏感性及其增殖力; Annexin V-FITC/PI 流式细胞实验检测细胞凋亡率。 **结果** 与阴性对照组比较, miRNA-101 转染组细胞 miRNA-101 表达量及细胞凋亡率增加 $[(1.000 \pm 0.022) \text{ vs } (5.380 \pm 0.246), P < 0.05]$, $[(11.020 \pm 0.685) \% \text{ vs } (26.158 \pm 1.278) \%, P < 0.05]$; BDNF mRNA 表达量降低 $[(1.000 \pm 0.042) \text{ vs } (0.389 \pm 0.055), P < 0.05]$; 顺铂 IC₅₀ 及细胞增殖力均下降 $[(57.276 \pm 1.717) \text{ vs } (33.176 \pm 2.465), P < 0.05]$, $[(1.776 \pm 0.030) \text{ vs } (1.642 \pm 0.252), P < 0.05]$ 。 **结论** miRNA-101 可有效增加 SKOV3/DDP 细胞对顺铂的药物敏感性, 促进细胞凋亡。

关键词: miRNA-101; 卵巢癌; 顺铂; BDNF mRNA; 增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R737.31

文献标识码: A

Effect of miRNA-101 on chemosensitivity of SKOV3/DDP cells to Cisplatin*

Juan Dai¹, Ping Han¹, Yan-hua Cao², Xiu-juan Wang¹, Li Yang¹, Xiao-han Yu³

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, the Affiliated Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. School of Public Health,
3. School of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology,
Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of miRNA-101 on Cisplatin sensitivity of chemo-resistant epithelial ovarian cancer SKOV3/DDP cells and the related mechanism. **Methods** In this study, the expression of miRNA-101 in SKOV3/DDP cells was up-regulated by transfection. Meanwhile, RT-PCR assay was applied to detect the expressions of miRNA-101 mRNA and BDNF mRNA, and CCK-8 kit was used to measure the Cisplatin sensitivity and proliferative ability of SKOV3/DDP cells. In addition, the apoptosis of SKOV3/DDP cells was detected by Annexin V-FITC/PI flow cytometry. **Results** Compared with the control group, the expression of miRNA-101 and the apoptosis rate of miRNA-101 in the transfected group increased significantly $[(1.000 \pm 0.022) \text{ vs } (5.380 \pm 0.246), P < 0.05]$, $(11.020 \pm 0.685) \% \text{ vs } (26.158 \pm 1.278) \%, P < 0.05]$. The expression of BDNF mRNA decreased significantly $[(1.000 \pm 0.042) \text{ vs } (0.389 \pm 0.055), P < 0.05]$, and the Cisplatin IC₅₀ and the proliferative ability of SKOV3/DDP cells were obviously decreased after transfection $[(57.276 \pm 1.717) \text{ vs } (33.176 \pm 2.465), P < 0.05]$, $(1.776 \pm 0.030) \text{ vs } (1.642 \pm 0.252), P < 0.05]$. **Conclusions** miRNA-101 could effectively enhance the Cisplatin sensitivity and promote the apoptosis of SKOV3/DDP cells.

Keywords: miRNA-101; epithelial ovarian cancer; Cisplatin; BDNF mRNA; proliferation; apoptosis

收稿日期: 2016-11-10

* 基金项目: 河北省临床医学优秀人才培养 (No. 310103020704)

[通信作者] 韩萍, E-mail: myhanping800@163.com

卵巢癌是致死率最高,预后最差的妇科恶性肿瘤。由于缺乏早期临床症状及特异性筛查指标,大部分患者确诊时分期较晚。尽管在最佳的肿瘤细胞减灭术后给予顺铂为基础的联合化疗,由于残存癌细胞耐药性的出现,因此目前卵巢癌患者的5年复发率仍处于较高水平。卵巢癌细胞的顺铂耐药机制尚未明确,寻找有效的抑制癌细胞对顺铂耐药的方法是当前急需解决的问题。目前研究提示脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)与肿瘤耐药的形成存在着密切关系,可被相关 miRNAs 抑制,从而逆转细胞的耐药性^[1]。miRNA-101 是一种小分子调节 RNA,在细胞中发挥着抑癌基因的作用,其高表达可增加非小细胞肺癌的顺铂敏感性^[2]。本研究通过上调 miRNA-101 在上皮性卵巢癌顺铂耐药细胞 SKOV3/DDP 的表达,检测 miRNA-101 对 SKOV3/DDP 细胞 BDNF mRNA 表达、顺铂敏感性、增殖及凋亡的影响,旨在为卵巢癌化疗耐药的基因治疗寻找新的靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

上皮性卵巢癌顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 购于上海拜力生物有限公司。

1.2 仪器与试剂

RPMI1640 培养基(海克隆公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);Lipofectamine 2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司);miRNA-101 质粒、miRNA-NC(中国上海吉玛生物有限公司);Trizol、miRNA cDNA Synthesis Kit、EXPRESS SYBR GreenERTM miRNA qRT-PCR Kit(日本 TaKaRa 公司);顺铂(Sigma 公司)、CCK-8 试剂盒(日本同仁公司);梯度 PCR 仪(美国 Bio-rad)、定量 PCR 反应仪(美国 Bio-rad CFX96)、流式细胞仪(BD FACSCalibur)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的选择、培育及分组 上皮性卵巢癌顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 为研究对象,培养于含 1%(青霉素+链霉素)、15%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中,于 37℃、二氧化碳 CO₂ 含量 5%,相对湿度 90%培养箱中呈单层贴壁生长,根据细胞生长状况 2~3 d 给予换液或传代。细胞随机分为:阴性对照组、转染试剂组、空白质粒组、miRNA-101 转染组。

1.3.2 细胞转染 取对数生长期细胞,用 0.25%胰

蛋白酶消化并计数,无双抗培养基重悬细胞,按照每孔 $1.0 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5$ 个细胞接种于 6 孔板,37℃,5%CO₂ 培养箱中培养 24 h 后进行转染:弃培养板原培养基,1×PBS 洗涤 1 次。阴性对照组:2 ml Opti-MEM 培养基;转染试剂组:2 ml Opti-MEM 培养基包含 5 μl Lipofectamine 2000 转染试剂;空白质粒组:2 ml Opti-MEM 培养基包含 5 μg Lipofectamine 2000 转染试剂及 2 μg miRNA-NC;miRNA-101 转染组:2 ml Opti-MEM 培养基包含 5 μg Lipofectamine 2000 转染试剂及 2 μg miRNA-101。6 h 后更换转染培养基为无双抗培养基,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱继续培养,进行后续实验。

1.3.3 细胞转染结果鉴定及 BDNF mRNA 表达水平测定 转染 24 h 后,Trizol 提取各组细胞的总 RNA,测定浓度后用 PrimeScript™ RT reagent Kit 去除 DNA 并进行逆转录。随即将引物及核苷酸聚合酶等配制为反应体系。miRNA-101 的正向引物:5'-TACAGACTGTGATAACTGAAG-3';反向引物:5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'。BDNF 正向引物:GCCGACTTATGCCCACCATC;反向引物:GC-CACATTTGGCTCCCAAC 配制好的反应体系在反应条件下:(95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 30 s)扩增 40 个循环,连续监测荧光并记录 PCR 扩增曲线,以获得目的基因 miRNA-101/BDNF 和内参基因 U6/GAPDH 的 Ct 值,利用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各实验组目的基因相对于阴性对照组目的基因的表达量。

1.3.4 顺铂敏感性测定 对数生长期的 SKOV3/DDP 细胞生长至 80%~90%时,用 0.25%胰蛋白酶消化细胞并计数,无双抗培养基重悬为单细胞悬液,细胞按 2×10^3 个/孔的浓度接种于 96 孔板,置 37℃,5%CO₂ 培养箱中培养 24 h,更换培养基并进行转染,6 h 后更换转染培养基为无双抗培养基。继续培养 18 h 后更换为含顺铂浓度如 0、10、20、40、60、80 和 100 μmol/L 的营养基。加药后继续培养 24 h 后加入 CCK-8 10 μl/孔,震荡 10 s,继续培养 1.5 h,酶标仪检测各孔在波长为 450 nm 的吸光度。每组设 5 个复孔,取平均值,计算不同浓度顺铂对各组细胞的存活率。抑制率(%)=[(对照孔 OD 值-实验孔 OD 值)/(对照孔 OD 值-空白孔 OD 值)]×100%。以 OD 值为纵轴,顺铂浓度为横轴绘制细胞存活曲线。应用 SPSS 的 Probit 程序计算 IC₅₀。

1.3.5 细胞增殖力测定 对数生长期的 SKOV3/DDP 细胞重悬后接种于 96 孔板,分别于转

染后 1、2、3、4、5 和 6 d 向 96 孔板加入 CCK-8 $10 \mu\text{l}$ / 孔,震荡 10 s,继续培养 1.5 h 后,酶标仪检测各孔在波长为 450 nm 处 OD 值,以 OD 值为纵轴,时间为横轴绘制细胞生长曲线,评估细胞增殖力。

1.3.6 细胞凋亡率测定 取转染后 24 h 的各组 SKOV3/DDP 细胞,弃培养基,PBS 洗涤 2 次;0.25% 胰酶消化后重悬收集于离心管中,PBS 洗涤,1 000 r/min 离心 3 min,重复 2 次。用 $1 \times$ Annexin V Binding Solution 制成浓度为 1×10^6 个 / ml 单细胞悬液,取 $100 \mu\text{l}$,向其内加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin V, FITC 结合物及 $5 \mu\text{l}$ PI Solution,室温避光培养 15 min,最后加入 $400 \mu\text{l}$ $1 \times$ Annexin V Binding Solution 稀释,流式细胞仪检测凋亡率。

1.4 统计学方法

所有实验均重复 3 次,应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组样本间比较采用单因素方差分析 (one-way, ANOVA),两两比较采用小差异法方法检验 (least significant difference, LSD), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-101 转染效果及 BDNF mRNA 表达情况

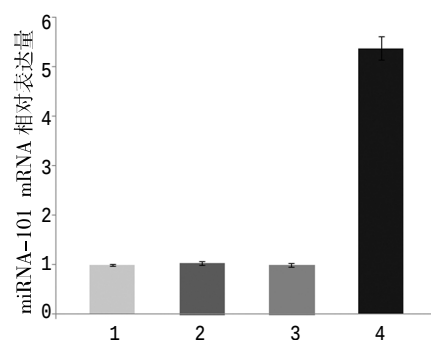
SKOV3/DDP 细胞转染 24 h 后,实时荧光定量 PCR 检测各组细胞 miRNA-101 表达情况:阴性对照组 (1.000 ± 0.022)、转染试剂组 (1.034 ± 0.044)、空白质粒组 (0.991 ± 0.048)、miRNA-101 转染组 (5.380 ± 0.246);miRNA-101 转染组 miRNA-101 表达量较各对照组增高,差异有统计学意义 ($F = 879.699, P = 0.000$),说明转染成功,效率较高,见图 1。而各组 SKOV3/DDP 细胞 BDNF mRNA 表达情况:阴性对照组 (1.000 ± 0.042)、转染试剂组 (0.980 ± 0.037)、空白质粒组 (1.041 ± 0.078)、miRNA-101 转染组 (0.389 ± 0.055)。结果显示:miRNA-101 转染组 SKOV3/DDP 细胞 BDNF mRNA 表达量较各对照组降低 ($F = 108.549, P = 0.000$)。可见 SKOV3/DDP 细胞内过表达的 miRNA-101 可通过抑制 BDNF mRNA 的表达,从而发挥生物学作用。见图 2。

2.2 miRNA-101 对 SKOV3/DDP 的顺铂敏感性及增殖力的影响

CCK-8 检测顺铂作用 24 h 后各组 SKOV3/DDP 细胞存活率结果如图 3;Probit 计算各组 IC₅₀:阴性

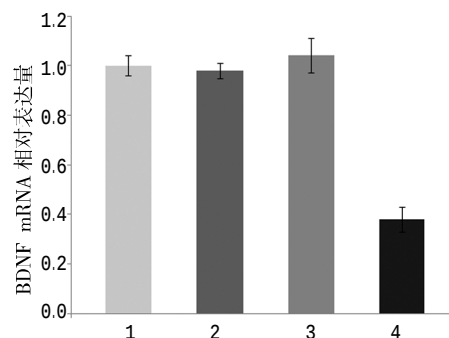
对照组 (57.276 ± 1.717)、转染试剂组 (56.703 ± 2.069)、空白质粒组 (56.426 ± 2.150)、miRNA-101 转染组 (33.176 ± 2.465) ($F = 93.435, P = 0.000$)。结果显示:miRNA-101 转染组细胞 IC₅₀ 较对照组降低,证明过表达 miRNA-101 可逆转 SKOV3/DDP 的耐药,增加对顺铂的药物敏感性。

CCK-8 检测各组细胞增长状况,如图 4 所示,前 72 h miRNA-101 转染组细胞增殖速率较对照组缓慢,72 h 后 miRNA-101 转染组细胞凋亡速率较对照组稍快;以 72 h 各组所测定 OD 值进行分析:阴性对照组 (1.776 ± 0.030)、转染试剂组 (1.739 ± 0.036)、空白质粒组 (1.780 ± 0.019)、miRNA-101 转



1: 阴性对照组;2: 转染试剂组;3: 空白质粒组;4: miRNA-101 转染组

图 1 各组 SKOV3/DDP 细胞 miRNA-101 表达情况



1: 阴性对照组;2: 转染试剂组;3: 空白质粒组;4: miRNA-101 转染组

图 2 各组 SKOV3/DDP 细胞 BDNF mRNA 表达情况

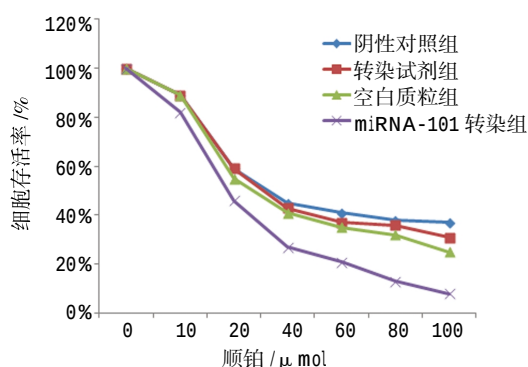


图 3 顺铂作用下各组 SKOV3/DDP 细胞存活情况

染组(1.642 ± 0.252)($F=15.135, P=0.001$)。结果显示:SKOV3/DDP 细胞 miRNA-101 表达量越高,增殖力越弱;说明高表达的 miRNA-101 可抑制 SKOV3/DDP 细胞的增殖。

2.3 miRNA-101 对 SKOV3/DDP 细胞凋亡的影响

SKOV3/DDP 细胞转染 24 h 后,Annexin-V/PI 双染流式细胞仪分析细胞凋亡情况:阴性对照组(11.020 ± 0.685)%、转染试剂组(11.518 ± 0.818)%、空白质粒组(11.881 ± 0.868)%、miRNA-101 转染组(26.158 ± 1.278)%;miRNA-101 转染组细胞凋亡率较阴性对照组增加,差异有统计学意义($F=367.527, P=0.000$)。提示:miRNA-101 在 SKOV3/DDP 细胞内

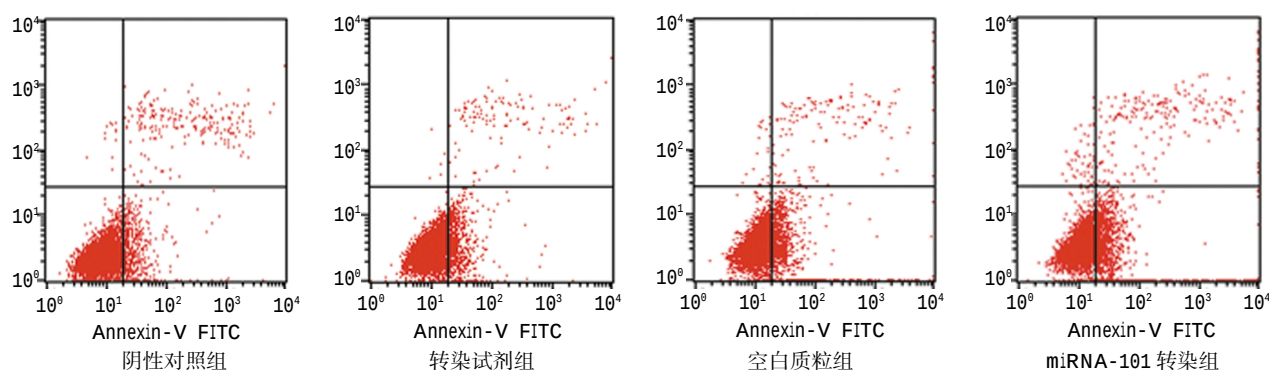


图 5 各组 SKOV3/DDP 细胞凋亡情况

3 讨论

由于卵巢癌细胞在化疗过程中极易发生耐药效应,导致卵巢癌的临床治疗在数十年的发展中陷入瓶颈状态,因此探究卵巢癌耐药的确切机制以及逆转耐药的方法已成为当前全球妇产科学界极为紧迫且重要的研究课题。

近年来相关研究提示 miRNAs 的异常表达与卵巢癌的形成、发展及耐药密切相关。miRNAs 是真核生物内一类由内源性基因编码的非编码小分子 RNA,通过与目标 mRNA 3' 端非编码区(3'-UTR)以碱基完全或非完全互补配对的方式结合,引起靶 mRNA 的降解或翻译抑制,在转录后水平调控基因表达,从而调节细胞增殖、分化与凋亡,参与个体发育、机体代谢以及肿瘤的形成、发展及耐药等。miRNAs 在肿瘤中异常表达且具有组织特异性,发挥着相当于癌基因或抑癌基因的作用。YANG 等^[3]通过对 456 例浆液性卵巢癌组织的 miRNA 进行整合分析,发现 miRNAs-101 在卵巢癌细胞中的表达存在差异。人类 miRNA-101 包括 miRNA-101-1 和 miRNA-101-2,分别位于人 1 和 9 号染色体中。研

发挥着抑癌基因的作用,过表达 miRNA-101 可促进细胞凋亡。见图 5。

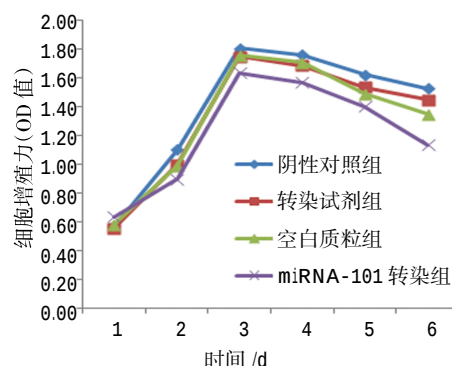


图 4 各组 SKOV3/DDP 细胞增殖情况

究表明,miRNA-101 在乳腺癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、结肠癌、肝癌及胃癌等肿瘤中表达均下调,提示 miRNA-101 的缺失可能与肿瘤的形成和发展有关^[4-5]。JI 等^[2]研究发现 miRNA-101 过表达可促进顺铂诱导的肺非小细胞肺癌 A549 的凋亡。邹勇象等^[6]研究发现 miR-101 能在表观遗传学水平抑制 STMN-1 的表达,从而抑制 U251 细胞的增殖力。SMITS 等^[7]研究发现在恶性胶质母细胞瘤(GBM)中,miR-101 的下调可导致靶基因 EZH2 过表达并诱导细胞增殖。LI 等^[8]研究发现 miRNA-101 在多种肿瘤中可通过抑制其靶基因 MCL-1、FOS、EZH2 的表达促进细胞凋亡。

BDNF 是一种小分子碱性蛋白质,主要在中枢神经系统内表达;目前其在肿瘤领域的研究显示其在神经母细胞瘤、呼吸、消化、生殖系统肿瘤中异常过表达,但在相应系统正常组织几乎不表达^[1]。SCALA 等^[9-10]研究显示神经母细胞瘤中高表达的 BDNF 可保护其肿瘤细胞免受长春碱毒性、顺铂、多柔比星、托泊替康等 DNA 损伤试剂的伤害,表现出较强的耐药性,而直接抑制 BDNF 的活性可以降低肿瘤细胞

的耐药性^[10-11]。于晓辉等^[11-12]研究发现 BDNF 及其 mRNA 在卵巢上皮癌中异常高表达,转移细胞中异常表达更甚,经顺铂、紫杉醇处理后的卵巢癌细胞耐药性更强。更有研究证实激活的 BDNF 与 TrkB 结合可以通过激活 MAPK、P13K/AKT 和 PLC 途径,刺激肿瘤细胞增殖和凋亡^[13-14]。LI^[15-16]研究证实 miR-200c 可靶向调节 BDNF/TrkB 的表达,在体外恢复卵巢癌、乳腺癌细胞 miR-200c 表达可增加肿瘤细胞对紫杉醇、多柔比星等药物的敏感性。

目前尚未关于 miRNA-101 与 BDNF 相互作用影响卵巢癌耐药细胞 SKOV3/DDP 顺铂敏感性的研究,因此本次研究应用阳离子脂质体转染技术在 SKOV3/DDP 细胞内过表达 miRNA-101。结果显示:miRNA-101 转染组 SKOV3/DDP 细胞 miRNA-101 表达量增高为阴性对照组 5.38 倍,转染效果佳;BDNF mRNA 表达量降低为阴性对照组 0.38 倍;顺铂 IC₅₀ 较阴性对照组降低,相同浓度顺铂作用下细胞抑制率较阴性对照组增加。本次研究结果表明:SKOV3/DDP 细胞过表达 miRNA-101 可有效抑制 BDNF mRNA 的表达,促进顺铂诱导的 SKOV3/DDP 细胞凋亡;提示 miRNA-101 可通过抑制 BDNF mRNA 的表达增加 SKOV3/DDP 细胞的顺铂敏感性,从而逆转细胞对顺铂的耐受性。细胞增殖实验结果显示:miRNA-101 组 SKOV3/DDP 细胞增殖力较各对照组降低,且平台期后,细胞凋亡较各对照组迅速。Annexin V-FITC/PI 流式细胞实验结果示:miRNA-101 组细胞凋亡率较阴性对照组增加。提示 miRNA-101 的高表达可直接或通过抑制 BDNF mRNA 的表达,抑制 SKOV3/DDP 细胞的增殖,促进细胞的凋亡。

综上所述,在 SKOV3/DDP 细胞内过表达 miRNA-101 可抑制 BDNF 基因的表达,增加细胞的顺铂敏感性,抑制肿瘤细胞增殖,并促进细胞凋亡。提示 BDNF 有可能为 miRNA-101 潜在的靶基因,待进一步研究证实。这对临床上卵巢肿瘤耐药的基因治疗具有重要意义,然而如何将该技术有效地应用到临床治疗中是进一步需要解决的问题。

参 考 文 献:

- [1] 莫赛军. BDNF/TrkB 信号途径与抗肿瘤治疗[J]. 癌变畸变突变, 2014, 26(6): 476-478.
- [2] JI Q Y, MING G W. MiR-101 sensitizes A549 NSCLC cell line to CDDP by activating caspase3 dependent apoptosis[J]. ONCOLOGY LETTERS, 2014, 7: 461-465.
- [3] YANG D, SUN Y, HU L, et al. Integrated analyses identify a master microRNA regulatory network for the mesenchymal subtype in serous ovarian cancer[J]. Cancer Cell, 2013, 23(2): 186-199.
- [4] FRIEDMAN J M. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2[J]. Cancer Res, 2009, 69: 2623-2629.
- [5] VARAMBALLY S. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer[J]. Science, 2008, 322: 1695-1699.
- [6] 邹勇象, 卢亦成. microRNA-101 调节 STMN1 的表达并参与调控 GBM 细胞增殖、迁移及侵袭的初步研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
- [7] SMITSM, NILSSON J, MIRSE, et al. MiR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2 induced proliferation, migration, and angiogenesis[J]. Oncotarget, 2010, 1(8): 710-720.
- [8] LI S, FU H, WANG Y, et al. MicroRNA-101 regulates expression of the v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog(FOS) oncogene in human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2009, 49(4): 1194-1202.
- [9] SCALA S, WOSIKOWSKI K, GIANNAKAKOU P, et al. Brain-derived neurotrophic factor protects neuroblastoma cells from vincristine toxicity[J]. Cancer Res, 1996, 56(16): 3737-3742.
- [10] MIDDLEMAS D S, KIHLE B K, MOODY N M. Brain derived neurotrophic factor protects human neuroblastoma cells from DNA damaging agents[J]. J Neurooncol, 1999, 45(1): 27-36.
- [11] 于晓辉. TrkB 介导的失巢凋亡抑制与卵巢癌的转移和耐药[D]. 上海: 上海交通大学, 2007.
- [12] 李明伟. Trkb 及其配体 BDNF 在卵巢上皮癌中的表达及其临床意义[J]. 中国妇产科临床杂志, 2012, 13(2): 122-125.
- [13] LIN C Y, CHEN H J, LI T M, et al. beta5 integrin up-regulation in brain-derived neurotrophic factor promotes cell motility in human chondrosarcoma[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e67990.
- [14] ZHANG S, GUO D, LUO W, et al. TrkB is highly expressed in NSCLC and mediates BDNF-induced the activation of Pyk2 signaling and invasion of A549 cells[J]. BMC Cancer, 2010(10): 43.
- [15] LI Z, OH D Y, NAKAMURA K, et al. Perifosine-induced inhibition of Akt attenuates brain-derived neurotrophic factor/TrkB-induced chemoresistance in neuroblastoma in vivo[J]. Cancer, 2011, 117(23): 5412-5422.
- [16] CITTELLY D M, DIMITROVA I, HOWE E N, et al. Restoration of miR-200c to ovarian cancer reduces tumor burden and increases sensitivity to paclitaxel[J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(12): 2556-2565.

(张西倩 编辑)