

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.06.008
文章编号: 1005-8982(2018)06-0045-05

miRNA-138 调控卵巢上皮癌细胞 对顺铂敏感性的机制研究

周宏博¹, 桂艺方²

(牡丹江医学院红旗医院 1. 肿瘤科, 2. 检验科, 黑龙江 牡丹江 157011)

摘要: 目的 探讨 miRNA-138 和沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (SIRT1) 的差异表达对卵巢上皮癌顺铂化疗敏感性的影响。**方法** 选取 2014 年 1 月-2017 年 1 月在牡丹江医学院红旗医院妇科就诊卵巢上皮癌患者 80 例。根据患者对顺铂化疗的敏感性分为顺铂敏感组和顺铂耐药组。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blot 检测卵巢上皮癌组织中 miRNA-138 和 SIRT1 的表达水平; 培养 SKOV3 细胞, 分别转染 miRNA-138 的类似物 (miRNA-138 mimic) 和抑制物 (miRNA-138 inhibitor) 后, qRT-PCR 检测 SIRT1 mRNA 的表达变化, 并采用 MTT 法检测细胞对顺铂的敏感性; SIRT1 mRNA 3'-UTR 野生型 (wt) 和突变型 (mut) 荧光素酶报告质粒与 miRNA-138 mimic 共转染, 双荧光素酶报告系统分析荧光素酶活性。**结果** 铂敏感组 miRNA-138 表达水平高于顺铂耐药组, 而 SIRT1 表达水平低于顺铂耐药组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 过表达 miRNA-138 可降低 SIRT1 的表达, 提高 SKOV3 细胞对顺铂的敏感性, 而抑制 miRNA-138 可提高 SIRT1 的表达, 降低 SKOV3 细胞对顺铂的敏感性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); miRNA-138 mimic 与 SIRT1 mRNA 3'-UTR 野生型质粒共转染, 荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$), 而与 SIRT1 mRNA 3'-UTR 突变型质粒共转染, 荧光素酶活性无变化 ($P > 0.05$)。**结论** miRNA-138 可能通过 SIRT1 调控卵巢上皮癌细胞对顺铂的敏感性, 可作为卵巢上皮癌顺铂化疗耐药治疗的靶点。

关键词: 卵巢上皮癌; miRNA-138; 沉默信息调节因子 2 相关酶 1; 顺铂; 敏感性

中图分类号: R737.31

文献标识码: A

Regulative role of miRNA-138 on platinum sensitivity of ovarian epithelial cancer cells

Hong-bo Zhou¹, Yi-fang Gui²

(1. Department of Oncology, 2. Department of Clinical Laboratory, Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China)

Abstract: Objective To investigate the regulative effect of miRNA-138 on chemo-sensitivity of ovarian epithelial cancer to platinum and potential mechanism. **Methods** Totally 80 cases of patients with ovarian epithelial cancer admitted into Mudanjiang Medical College Hongqi Hospital from January 2014 to January 2017 were included in this study. Patients were divided into two groups: platinum-sensitive group and platinum-resistant group. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and Western Blot were performed to detect the expression of miRNA-138 and SIRT1 in ovarian epithelial carcinoma. SKOV3 cell line were transfected with miRNA-138 analogs (miRNA-138 mimic group) and inhibitor (miRNA-138 inhibitor group). Expression of SIRT1 mRNA was measured by RT-qPCR. MTT assay was utilized for determination of sensitivity to platinum. SIRT1 mRNA 3'-UTR wild type and mutant type luciferase reporter plasmids were co-transfected with miRNA-138mimic, and double luciferase reporter system was used to analyze luciferase activity. **Results** The concentration of miRNA-138 in platinum-sensitive group was

收稿日期: 2017-05-23

[通信作者] 桂艺方, E-mail: 676294737@qq.com

significantly higher than that in platinum-resistant group, while levels of SIRT1 was significantly decreased compared with platinum-resistant group ($P < 0.05$). Overexpression of miRNA-138 decreased the expression of SIRT1 and increased the sensitivity of tumor cells to platinum ($P < 0.05$), which was reversed by inhibition of miRNA-138 ($P < 0.05$). Luciferase activity was significantly reduced in group with transfection of SIRT1 mRNA 3'-UTR wild-type plasmids, while no significant changes in luciferase activity were observed in transfected SIRT1 mRNA 3'-UTR mutant plasmid ($P > 0.05$). **Conclusion** MiRNA-138 may regulate the sensitivity of ovarian epithelial cancer cells to platinum through SIRT1 activity, which can be a potential therapeutic target of ovarian epithelial cancer.

Keywords: ovarian epithelial carcinoma; miRNA-138; SIRT1; platinum chemosensitivity

卵巢上皮癌 (epithelial ovarian cancer, EOC) 铂耐药的产生是导致化疗失败和肿瘤复发的主要原因^[1]。EOC 铂耐药的产生机制十分复杂, 目前仍不甚清楚。microRNAs (miRNAs) 是一类内源性的小分子非编码 RNA, 主要在转录后发挥基因表达调控作用, 参与多种生理及病理过程^[2-3]。文献报道, miRNA-138 在宫颈癌和膀胱癌等肿瘤细胞的增殖和侵袭中发挥重要作用^[4-5], 其在卵巢上皮癌中的表达及作用仍不清楚。研究显示 SIRT1 可调节肿瘤细胞对顺铂的敏感性^[6], 而生物信息学预测显示 SIRT1 是 miRNA-138 的靶基因, 因此本研究假设 miRNA-138 可通过 SIRT1 调节卵巢上皮癌细胞对顺铂化疗的敏感性, 为卵巢上皮癌铂耐药的产生机制提供实验基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2014 年 1 月 -2017 年 1 月在牡丹江医学院红旗医院妇科就诊的 EOC 患者 80 例为研究对象。本研究经本院伦理委员会批准, 患者知情同意并签署知情同意书。

1.1.1 纳入标准 ①既往无其他恶性肿瘤病史或自身免疫性疾病; ②在本院首次接受治疗或确诊的 EOC 患者; ③经分期手术或肿瘤细胞减灭术手术治疗; ④经病理检查确诊为 EOC; ⑤术后需行铂为基础的规范化疗; ⑥有完整的临床资料, 可进行随访 (包括肿瘤复发时间和总生存期)。

1.1.2 排除标准 ①合并严重肝肾功能障碍者; ②合并不能控制的高血压、高血糖或严重心脏疾病者。根据美国国立综合癌症网络 (national comprehensive cancer network, NCCN) 指南中对 EOC 铂敏感和铂耐药的判定标准^[7]将所有 EOC 患者分为铂敏感组和铂耐药组 (铂敏感: 初次接受铂类药物化疗, 停药后复发时间 >6 个月或不复发; 铂耐药: 初次接受铂类药

物化疗, 停药后 6 个月内复发)。其中铂耐药组患者 30 例。年龄 32 ~ 68 岁, 平均 (52.7 ± 6.2) 岁; 浆液性卵巢癌 15 例、黏液性卵巢癌 9 例、子宫内膜样癌 6 例; 早期 (I / II) 15 例、晚期 (III / IV) 15 例。铂敏感组患者 40 例。年龄 28 ~ 72 岁, 平均 (54.5 ± 8.1) 岁; 浆液性卵巢癌 18 例、黏液性卵巢癌 12 例、子宫内膜样癌 10 例; 早期 (I / II) 25 例、晚期 (III / IV) 15 例。两组患者年龄、肿瘤类型及分期比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 仪器和试剂

高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf)、Nano Drop 2000 (美国 Thermo Scientific) 普通 PCR 仪 (美国 Bio-Rad)、实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 仪 (上海风岭); 电泳仪、电转仪及凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad); Trizol RNA 提取试剂、Fast Quant RT Kit (With gDNase)、Fast Fire qPCR Pre Mix (SYBR Green) (天根公司)、miRNA-138 及 U6 引物 [上海生工 (生物) 工程股份有限公司]、蛋白提取试剂盒 (凯基公司)、SIRT1 抗体及 HRP 标记二抗 (美国 Abcam 公司)、ECL 发光液 (美国 Thermo Fisher 公司) 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 E1910 (美国 Promega 公司)。

1.2.1 qRT-PCR 检测所有患者卵巢上皮癌组织中 miRNA-138 和沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (silent information regulator factor 2 related enzyme 1, SIRT1) miRNA 的表达水平 Trizol 提取卵巢上皮癌组织中的总 RNA, 按 Fast Quant RT Kit 说明书将 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 分析。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 1 min; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 15 s (采集荧光), 重复 40 个循环; 熔解曲线分析。结果显示, PCR 扩增反应线性梯度良好, 熔解曲线峰形单一, 无杂峰, 说明引物特异性良好。SIRT1 相对表达水平以 GAPDH 的表达水平为参照, 根

据目的基因的相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 SIRT1 miRNA 的表达变化。MiRNA-138 相对表达水平以 U6 的表达水平为参照,与上述计算方法相同,计算 miRNA-138 的表达变化。

1.2.2 Western blot 检测所有患者卵巢上皮癌组织中 SIRT1 蛋白的表达水平 将卵巢上皮癌组织匀浆后,按蛋白提取试剂盒说明书提取总蛋白并定量。加入 Loading Buffer 混匀,100℃ 5 min 使蛋白变性。取 10 μ l 蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳,切取约 43 和 81 kD 位置的凝胶进行转膜操作,观察蛋白 Marker 的转移效率并采用 5% 的脱脂奶粉进行封闭 2 h,分别与 anti-SIRT1 和 anti- β -actin 4℃ 孵育过夜。PBST 洗膜 3 次后与 HRP 标记的二抗于室温孵育 2 h, PBST 洗膜 3 次后于凝胶成像分析仪上成像并分析条带灰度值。以 β -actin 表达量为参照,计算 SIRT1 与 β -actin 的比值并进行统计分析。

1.2.3 miRNA-138 mimic、inhibitor 及 SIRT1 3'-UTR 野生型及突变型质粒转染 取约 1×10^6 个细胞均匀铺于 6 孔板中,设置对照组 (Negative Control, NC)、miRNA-138 mimic 组、miRNA-138 inhibitor 组,共转 miRNA-138 mimic 与 SIRT1 3'-UTR 野生型质粒组及

共转 miRNA-138 mimic 与 SIRT1 3'-UTR 突变型质粒组,采用 Lipo™ 2000 试剂进行转染。48 h 后收集细胞进行后续试验分析,荧光素酶活性分析采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书,按步骤操作即可。

1.2.4 MTT 检测 SKOV3 细胞对顺铂的敏感性 将细胞吹打成单细胞悬液,在 96 孔板中加入细胞悬液 100 ml/孔 (约 1×10^4),37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 环境培养 24 h。除去培养液,分别加入普通培养液及含顺铂的培养液,每组 8 孔,孵育 48 h 后,除去培养液,每孔加 50 ml $1 \times$ MTT,37℃ 孵育 4 h,除去上清液,每孔加 150 ml DMSO,摇匀后用酶标仪测定 550 nm 波长处各孔的吸光度。

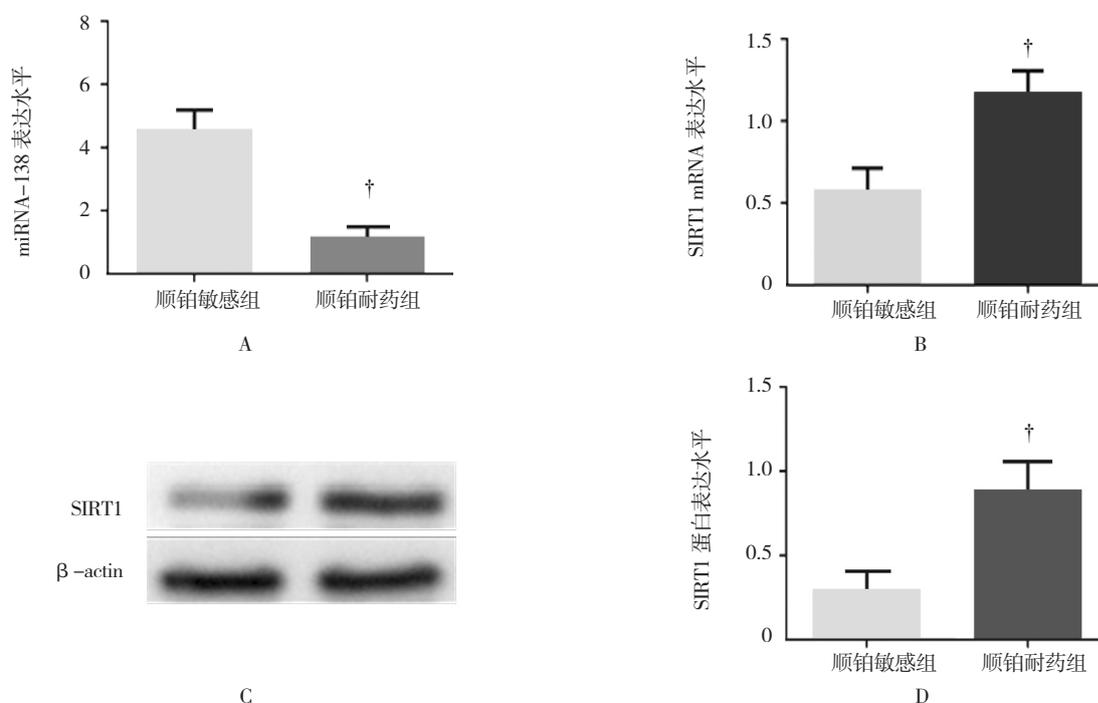
1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 Students' *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢上皮癌组织中 miRNA-138 和 SIRT1 的表达变化

与顺铂敏感组比较,铂耐药组 miRNA-138 的表



A: miRNA-138 的表达变化; B: SIRT1 mRNA 的表达变化; C: SIRT1 蛋白电泳图; D: SIRT1 蛋白表达变化统计图。† 与顺铂敏感组比较, $P < 0.01$

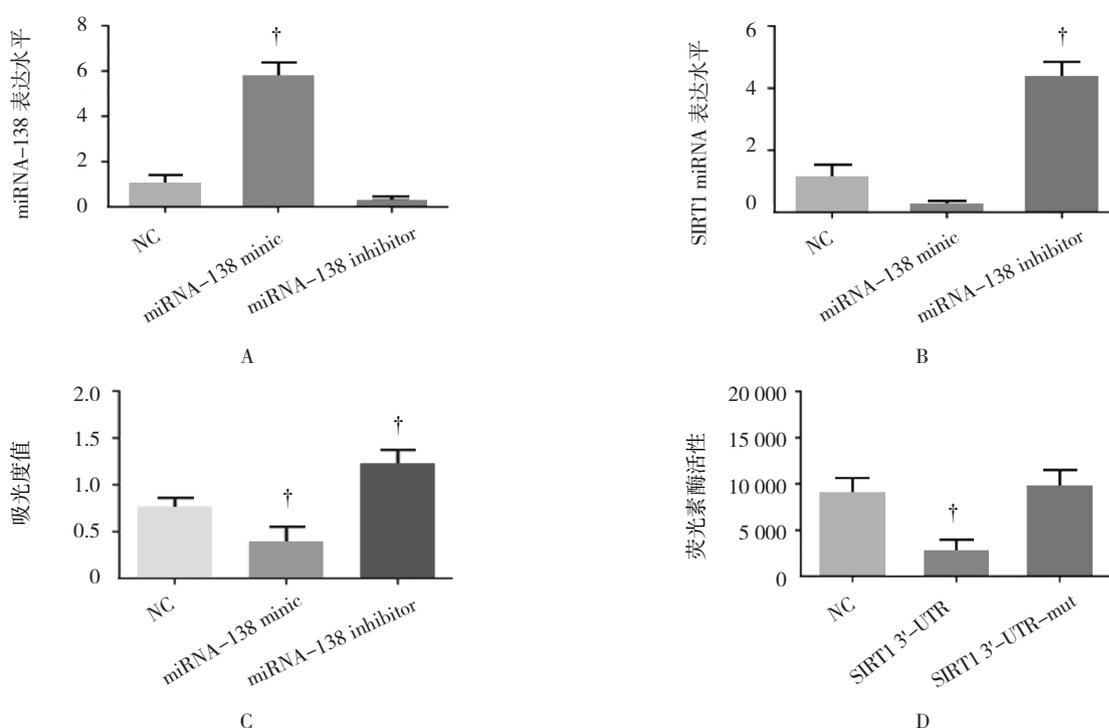
图 1 卵巢上皮癌组织中 miRNA-138 和 SIRT1 的表达变化

达水平降低 ($t=2.752, P=0.0332$), 而 SIRT1 的表达水平升高, 差异有统计学意义 (miRNA : $t=7.126, P=0.000$; 蛋白 : $t=5.468, P=0.000$), 见图 1。

2.2 miRNA-138 和 SIRT1 的差异表达对卵巢上皮癌顺铂化疗敏感性的影响

过表达 miRNA-138 后, SIRT1 miRNA 的表达水平降低, 细胞活力亦降低即对顺铂敏感性升高, 而抑制 miRNA-138 后, SIRT1 miRNA 的表达水平则升高, 细胞活力亦升高即对顺铂敏感性降低, 差异有统计学意义 (miRNA-138 : $F=61.99, P=0.000$; SIRT1 miRNA : $F=126, P=$

0.000 ; 吸光度 : $F=56.93, P=0.000$), 见图 2A~C。生物信息学分析结果显示, miRNA-138 与 SIRT1 3'-UTR 区有可能结合位点, 见图 2D。构建携带 SIRT1 mRNA 3'-UTR 野生型 (wild) 和突变型 (mut) 的 pGL3 重组萤光素酶报告基因质粒与 miRNA-138 mimic 共转染 SKOV3 细胞, 双萤光素酶报告基因检测系统分析萤光素酶活性。结果显示, 转染 SIRT1 miRNA 3'-UTR 野生型载体后萤光素酶活性降低 ($t=4.894, P=0.000$), 而转染 SIRT1 miRNA 3'-UTR 突变型载体后, 萤光素酶活性无变化 ($t=0.3221, P=0.7511$), 见图 2E。



Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	
Position 32-39 of SIRT1 3' UTR	5' ...GUACAGGAAUUGUUC-CACCAGCA...
hsa-miR-138-5p	3' GCCGGACUAAGUGUUGUGUCGA

E

A: 过表达和抑制 miRNA-138 的表达情况; B: 过表达和抑制 miRNA-138 后 SIRT1 的表达变化; C: 过表达和抑制 miRNA-138 后细胞活力改变; D: 生物信息学分析 miRNA-138 与 SIRT1 3'-UTR 的结合位点; E: 双萤光素酶活性分析。† 与 NC 组比较, $P<0.01$

图 2 miRNA-138 通过 SIRT1 调控卵巢上皮癌细胞对铂的敏感性

3 讨论

卵巢上皮癌发病隐匿、进展迅速, 是目前致死率最高的妇科恶性肿瘤, 每年可导致全球 125 000 人死亡^[8]。至少约 20% 的卵巢上皮癌患者对一线化疗药物

天然耐药, 而化疗耐药是导致卵巢上皮癌治疗失败, 肿瘤复发及死亡率居高不下的重要原因之一^[9]。因此, 寻找卵巢上皮癌细胞耐药的靶点, 阐明其耐药产生机制是目前亟待解决的问题。

miRNAs种类繁多,在各种组织中广泛表达,具有重要的生理学调控作用,其表达异常可导致多种疾病的发生、发展。CHEN等^[10]发现,miRNA-130a与卵巢上皮癌铂耐药密切相关;CUI等^[11]研究发现,miRNA-146a可通过减少SOD2的产生抑制卵巢癌上皮癌细胞增殖并增强其对化疗的敏感性;WEI等^[12]报道miRNA-551b可通过下调Foxo3和TRIM31的表达介导卵巢癌细胞的增殖、侵袭及耐药的发生。以上文献提示miRNAs在卵巢上皮癌顺铂耐药中发挥重要作用。

SIRT1是sirtunis家族一员,是一种组蛋白去乙酰化酶,其所介导的生理过程包括转录沉默、细胞分化、细胞增殖和氧化应激等^[13]。组蛋白乙酰化是一种表观遗传学修饰方式,该修饰可通过改变组蛋白二级结构使转录因子更易于与基因启动子区结合,而组蛋白去乙酰化则使转录因子难以与基因启动子区结合,从而发挥调控基因表达的作用。研究报道,SIRT1通过改变肿瘤细胞的线粒体代谢参与顺铂耐药的产生^[14]。同时SIRT1也是一种DNA修复基因。而顺铂是一种细胞周期非特异性抗癌化疗药物,可结合肿瘤细胞DNA上的碱基,使DNA分子形成链内和链间的交叉键联,从而抑制肿瘤细胞的DNA合成与修复。因此SIRT1可能通过修复肿瘤细胞的DNA对抗顺铂。生物信息学分析结果显示SIRT1是miRNA-138的靶基因,因此本研究假设miRNA-138可能通过调控SIRT1的表达参与卵巢上皮癌顺铂耐药。研究结果显示,过表达miRNA-138后,SIRT1 miRNA的表达水平降低,细胞活力亦降低,即对顺铂敏感性升高;而抑制miRNA-138后,SIRT1 miRNA的表达水平则升高,细胞活力亦升高,即对顺铂敏感性降低,有差异。因本研究对细胞的处理只有过表达或敲减miRNA-138的表达和加入药物顺铂,而过表达或敲减miRNA-138并不影响细胞活力。因此,若细胞活力发生变化则为对顺铂的敏感性发生改变。miRNA主要通过与其靶基因miRNA 3'-UTR区相互作用调控基因的表达。因此,笔者构建携带SIRT1 miRNA 3'-UTR野生型和突变型荧光素酶报告基因质粒与miRNA-138 mimic共转染SKOV3细胞,采用双荧光素酶报告基因检测系统分析荧光素酶活性。结果显示,转染SIRT1 miRNA 3'-UTR野生型载体后荧光素酶活性降低,而转染SIRT1 miRNA 3'-UTR突变型载体后,荧光素酶活性无变化,说明miRNA-138可结合到SIRT1 miRNA 3'-UTR区并调控其表达。

综上所述,miRNA-138可能通过SIRT1调控卵巢上皮癌细胞对铂类药物的敏感性,因此miRNA-138可作为卵巢上皮癌铂耐药防治的靶点。

参 考 文 献:

- [1] 谢聪,尹如铁,李玉玲,等. 铂耐药和铂敏感上皮性卵巢癌中ERCC1、survivin蛋白的表达及临床应用价值[J]. 四川大学学报(医学版),2011,42(1): 86-89.
- [2] CHEN J Q, PAPP G, SZODORAY P, et al. The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases[J]. *Autoimmun Rev*, 2016, 15(12): 1171-1180.
- [3] ALIPOOR S D, ADCOCK I M, GARSSEN J, et al. The roles of miRNAs as potential biomarkers in lung diseases[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016(791): 395-404.
- [4] ZHOU N, FEI D, ZONG S, et al. MicroRNA-138 inhibits proliferation, migration and invasion through targeting hTERT in cervical cancer[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 3633-3639.
- [5] YANG R, LIU M, LIANG H, et al. miRNA-138-5p contributes to cell proliferation and invasion by targeting Survivin in bladder cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1): 82.
- [6] CAO B, SHI Q, WANG W. Higher expression of SIRT1 induced resistance of esophageal squamous cell carcinoma cells to cisplatin[J]. *J Thorac Dis*, 2015, 7(4): 711-719.
- [7] AJANI, JAFFER & AD'AMICO, THOMAS & A HAYMAN, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: rectal cancer (Version 2)[J]. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2009(1): 28-39.
- [8] Sankaranarayanan, R & Ferlay. Worldwide burden of gynecological cancer: The size of the problem[J]. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 2016(20): 207-25.
- [9] 刘玲. miRNA-mRNA差异表达与卵巢上皮癌多药耐药关系的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2014.
- [10] CHEN C, WANG H J, YANG L Y, et al. Expression of MiR-130a in serum samples of patients with epithelial ovarian cancer and its association with platinum resistance[J]. *Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)*, 2016, 47(1): 60-63.
- [11] CUI Y, SHE K, TIAN D, et al. miR-146a Inhibits proliferation and enhances chemosensitivity in epithelial ovarian cancer via reduction of SOD2[J]. *Oncol Res*, 2016, 23(6): 275-282.
- [12] WEI Z, LIU Y, WANG Y, et al. Downregulation of Foxo3 and TRIM31 by miR-551b in side population promotes cell proliferation, invasion, and drug resistance of ovarian cancer[J]. *Med Oncol*, 2016, 33(11): 126.
- [13] 林琴琴,马雪,林蓉,等. 组蛋白去乙酰化酶Sirt1与心血管系统疾病[J]. *中南医学科学杂志*, 2011, 39(6): 601-606.
- [14] LIANG XJ, FINKEL T, SHEN D W, et al. SIRT1 contributes in part to cisplatin resistance in cancer cells by altering mitochondrial metabolism[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(9): 1499-506.

(王荣兵 编辑)