

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.20.009

文章编号: 1005-8982(2016)20-0040-04

论著

MicroRNA-200b 在卵巢癌组织及血浆中的表达及其对癌细胞侵袭迁移的影响

李伟宏

(河南省郑州市澍青医学高等专科学校, 河南 郑州 450064)

摘要:目的 观察 microRNA-200b(简称 miR-200b)在上皮性卵巢癌(EOC)患者卵巢组织以及血浆中的表达水平,探讨 miR-200b 对卵巢癌细胞侵袭迁移的影响。**方法** 选取 2014 年 12 月-2015 年 12 月郑州澍青医学高等专科学校附属医院经病理确诊为 EOC 患者 36 例(EOC 组),另选取同期因子宫肌瘤或子宫腺肌病及其他非卵巢病变行手术切除者共 20 例作为对照组。采用实时荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR)法检测 EOC 患者和正常对照组卵巢组织及血浆中 miR-200b 表达水平,人卵巢癌细胞 SK-OV-3 转染 miR-200b 抑制物后,采用 transwell 法观察细胞侵袭能力,并采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 MMP-9 的 mRNA 及蛋白表达水平。**结果** miR-200b 在上皮性卵巢癌患者卵巢组织及血浆中的表达水平均显著高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);miR-200b 抑制物可明显降低 SK-OV-3 细胞迁移能力,差异有统计学意义($P < 0.01$);且 MMP-9 的 mRNA 及蛋白水平均明显降低($P < 0.01$)。**结论** miR-200b 在上皮性卵巢癌组织中高表达,miR-200b 可能通过影响 MMP-9 来促进卵巢癌细胞的侵袭迁移。

关键词: microRNA-200b; 上皮性卵巢癌; 侵袭; MMP-9

中图分类号: R737.31

文献标识码: A

Expression of miRNA-200b in ovarian cancer tissue and plasma and its effects on cancer cell migration

Wei-hong Li

(Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou, Henan 450064, China)

Abstract: Objective To observe the expression of *miRNA-200b* in ovarian tissue and plasma of EOC patients, and to investigate effects of *miRNA-200b* on invasion and migration of ovarian cancer cells. **Methods** From December 2014 to December 2015, 36 cases of diagnosed EOC patients (EOC group) in our hospital were selected as EOC group. And 20 cases of patients underwent surgical resection because of uterine leiomyoma or adenomyosis and other non ovarian lesions over the same period were selected as control group. RT-PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of *miRNA-200b* in ovarian tissue and plasma of two groups. After *SK-OV-3* cells interference *miRNA-200b* inhibitor, cell invasion ability was observed with transwell method. The mRNA and protein levels of MMP-9 were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** The expression of *miRNA-200b* in ovarian tissues and plasma of the EOC group were significantly higher than the control group ($P < 0.001$). After interference of *miRNA-200b* in *SK-OV-3* cells, the cell invasion ability was reduced, and the mRNA and protein levels of MMP-9 were decreased. **Conclusions** The expressions of *miRNA-200b* in EOC are increased. The *miRNA-200b* may facilitate the migration of ovarian cancer cells by affecting *MMP-9*.

Keywords: *miRNA-200b*; epithelial ovarian cancer; invasion and metastasis; *MMP-9*

卵巢癌是女性生殖道常见的恶性肿瘤之一,占女性生殖道肿瘤病死率的第一位^[1]。上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)是最常见的卵巢肿瘤类型,由于早期诊断率低及对化疗药物较高的耐药性导致 5 年生存率低于 20%^[2]。寻找特异性和敏感性均较高的新的肿瘤标志物,并与多种筛查方法相结合有望提高对上皮性卵巢癌的早期诊断。本研究对上皮性卵巢癌患者病变组织及外周血中 microRNA-200b(简称 miR-200b)的表达进行检测,以便了解 miR-200b 在上皮性卵巢癌中的临床意义,并对 miR-200b 影响癌细胞侵袭迁移的机制进行初步探究。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2014 年 12 月 -2015 年 12 月于郑州澍青医学高等专科学校附属医院经病理确诊为上皮性卵巢癌的患者 36 例(EOC 组),年龄 38 ~ 56 岁,平均 45 岁;另选取同期因子宫肌瘤或子宫腺肌病及其他非卵巢病变行子宫全切除 + 单侧(或双侧)附件切除术者共 20 例作为对照组,术后病理检查证实为正常卵巢,年龄 36 ~ 57 岁,平均 46 岁。两组年龄差异无统计学意义。所有选择病例术前均未进行化疗、放疗或激素治疗。所有样本均经研究对象同意,并签署知情同意书。

1.2 主要试剂

人卵巢癌细胞系 SK-OV-3 购自上海中国科学院细胞库,McCoy'5A 细胞培养基购自 Sigma 公司,胎牛血清、双抗购自 Gibco 公司, RNA 提取试剂盒 Trizol 购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒、DNA Marker、PCR 试剂盒、SYBR qRT-PCR 试剂盒等均购自大连宝生生物工程有限公司。miR-200b、miR-200b 抑制物及 U6 内参的引物由上海英骏生物技术有限公司设计合成;兔抗人 MMP-9 购自 Cell signaling 公司,HRP 标记的羊抗兔二抗、兔抗人 β -actin 购自北京博奥森公司。

1.3 组织和血浆标本总 RNA 提取及逆转录反应

两组患者手术中所取卵巢癌及正常卵巢组织,置入 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。此外,EOC 组和对照组术前均于清晨空腹抽静脉血 5 ml,加入 EDTA 抗凝剂,2 h 内于 4℃ 下高速离心 $3\ 000 \times g$, 5 min。离心后提取上层血浆放入 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。

取约 100 mg 组织或 200 μ l 血浆,加入 1 ml Tri-

zol,充分匀浆,抽提总 RNA,所得 RNA 溶于 25 μ l 的 DEPC 水中。经紫外分光光度计对提取的总 RNA 定量及检测纯度。进一步用 Takara 逆转录试剂盒进行逆转录,cDNA 产物置入 -20℃ 冰箱冷冻保存备用。引物序列如下:miR-200b:正向引物 5'-GGG TAATACTGCCTGGTAA-3';反向引物 5'-TTTGGCAC TAGCACATT-3'。U6:正向引物 5'-CTCGCTTCGGC AGCACA-3';反向引物 5'-AACGCTTCACGAATTT-3'。qRT-PCR 扩增条件:50℃ 孵育 2 min,95℃、Taq 酶活化 10 min,95℃、15 s,60℃、1 min,共 40 个循环。运用目的基因 Ct 值与内参 U6 的 Ct 值之差 Δ Ct(Ct 目的基因 - Ct 管家基因)值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 miR-200b 的相对表达量,美国 ABI PRISM[®]7300 Real-time PCR Systems 进行检测及分析。

1.4 细胞培养及转染

人卵巢癌细胞系 SK-OV-3 细胞培养于 McCoy'5A 培养基[含有 10% 胎牛血清(FBS)、100 u/ml 青霉素和 100 u/ml 链霉素],在 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 饱和湿度细胞培养箱内生长。按说明书将 miR-200b 抑制物与脂质体 2000(美国 Invitrogen 公司)混合静置后转染 SK-OV-3 细胞,48 h 后采用 qRT-PCR 检测其干扰效率。

1.5 细胞侵袭实验

取对数生长期的 SK-OV-3 细胞及转染后 SK-OV-3 细胞,调整细胞密度至 3×10^5 个/ml,按 0.1 ml/孔加到 transwell 小室的上层,上室预先用 100 μ l Matrigel 胶包被后紫外线照射 2 h。小室下层加入 1 ml 含有 10% 胎牛血清的培养液。培养 24 h 后,对已穿至小室下层的细胞固定并用结晶紫染色后显微镜(Olympus)进行计数(随机选取 5 个视野),实验重复 6 次,设平行复孔。

1.6 免疫印迹检测蛋白水平

收集 SK-OV-3 及转染 miR-200b 抑制物 48 h 后 SK-OV-3 细胞,蛋白裂解液处理并制备蛋白样品,根据蛋白定量结果调整每孔的上样量,将蛋白样品加在 10% SDS-PAGE 胶中进行电泳,电泳结束后用湿转法将蛋白转到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温震荡封闭 2 h,一抗分别加兔抗人的 MMP-9(1 : 1 000 稀释)、兔抗人 β -actin(1 : 3 000 稀释),4℃ 孵育过夜后,HRP 标记的羊抗兔二抗(1 : 3 000 稀释)室温孵育 1 h,加 ECL 发光液进行化学发光显影,UVP 凝胶成像仪(Gel Doc-It TS2 310 Imaging

System)拍照检测。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析,统计作图用 Graph Pad Prism 5.0 软件,计量资料主要为计量数据,均通过正态性检验;多组间比较为单因素方差分析+LSD 多重比较,两组间差异比较用 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EOC 组和对照组的卵巢组织及外周血中 miR-200b mRNA 水平的比较

与对照组正常卵巢组织比较,EOC 组卵巢组织中 miR-200b mRNA 的表达水平显著增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。EOC 组患者外周血中 miR-200b mRNA 表达水平显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 低表达 miR-200b 对 SK-OV-3 细胞侵袭功能的影响

与空白及空转对照比较,SK-OV-3 细胞转染 miR-200b 抑制物后,其 miR-200b mRNA 水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明抑制表达效果成功。细胞侵袭实验中,与对照组比较,SK-OV-3 细胞转染 miR-200b 抑制物后,transwell 小室下层细胞数量显著减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示 miR-200b 可能与卵巢癌细胞侵袭能力密切相关。见表 2。

2.3 干扰 miR-200b 对 SK-OV-3 细胞 MMP-9 的 mRNA 和蛋白表达影响

为了探讨 miR-200b 影响 SK-OV-3 细胞侵袭的机制,本实验检测干扰 miR-200b 基因后 SK-OV-3 细胞中 MMP-9 的水平。结果发现,与对照组比较,干扰 miR-200b 的 SK-OV-3 细胞表达 MMP-9 的 mRNA 和蛋白水平均显著降低,提示 miR-200b 可能是通过促进 MMP-9 的表达来影响癌细胞的侵袭能力。见表 3 和附图。

表 1 EOC 组和对照组组织中 miRNA-200b mRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-200b mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
卵巢组织			
对照组($n=20$)	1.21 ± 0.24	20.681	0.000
EOC 组($n=36$)	5.26 ± 1.13		
外周血			
对照组($n=20$)	1.16 ± 0.35	11.820	0.000
EOC 组($n=36$)	3.48 ± 1.08		

表 2 低表达 miR-200b 对 SK-OV-3 细胞侵袭功能的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

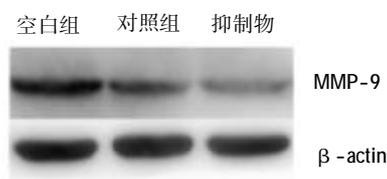
组别	miR-200b mRNA 水平	细胞数量
A:抑制物	0.41 ± 0.04	23.1 ± 1.1
B:对照组	0.94 ± 0.03	34.7 ± 1.1
C:空白组	1.00 ± 0.01	35.2 ± 1.3
<i>F</i> 值	756.346	187.355
<i>P</i> 值	0.000	0.000
t_1, P_1 值	31.763, 0.000	16.071, 0.000
t_2, P_2 值	35.320, 0.000	17.380, 0.000
t_3, P_3 值	3.558, 0.003	1.309, 0.210

注: t_1, P_1 值:A vs B; t_2, P_2 值:A vs C; t_3, P_3 值:B vs C

表 3 低表达 miR-200b 对 SK-OV-3 细胞 MMP-9 表达水平的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	MMP-9 mRNA 水平
A:抑制物	0.45 ± 0.04
B:对照组	0.82 ± 0.04
C:空白组	1.00 ± 0.01
<i>F</i> 值	442.761
<i>P</i> 值	0.000
t_1, P_1 值	19.621, 0.000
t_2, P_2 值	29.186, 0.000
t_3, P_3 值	9.565, 0.000

注: t_1, P_1 值:A vs B; t_2, P_2 值:A vs C; t_3, P_3 值:B vs C



附图 低表达 miR-200b 对 SK-OV-3 细胞 MMP-9 蛋白表达的影响

3 讨论

上皮性卵巢癌(EOC)在卵巢恶性肿瘤中最为常见,发病隐匿,大多数患者确诊时已到晚期(Ⅲ期或Ⅳ期)而晚期患者的 5 年生存率低于 20%,死亡率高居妇科恶性肿瘤之首^[3]。上皮性卵巢癌的发生、发展是一个多种癌基因和抑癌基因的表达失衡的过程,在该过程中,miRNA 通过差异表达在基因组上

通过调节肿瘤相关的靶基因(如 ZEB1、HSF1 等),从而发挥着类似于致癌或抑癌的功能^[4-6]。

miRNA 是一种新近发现的非编码小分子 RNA,参与调控细胞生长分化、能量代谢、凋亡等生理过程^[7]。近年来发现,多数 miRNAs 定位在与肿瘤相关的染色体部位,miRNAs 可以调控肿瘤相关基因,参与肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭或血管形成等过程,与人类肿瘤发生、发展有着密切关系^[8]。miR-200 家族在上皮性卵巢癌及多种恶性肿瘤中异常表达^[9]。IORIO^[10]对上皮性卵巢癌进行多种 miRNA 的筛查发现,上皮性卵巢癌中表达上调倍数最高的是 miR-200 家族,提示 miR-200 家族在上皮性卵巢癌的发病机制中起着类似癌基因的作用,可用于上皮性卵巢癌的早期诊断。miR-200 家族有 5 个家族成员,miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141 和 miR-429。本研究对上皮性卵巢癌患者和正常对照组的卵巢组织及外周血中 miR-200b mRNA 表达水平进行比较,实验结果发现,EOC 患者卵巢组织和外周血中 miR-200b 的 mRNA 水平均显著高于正常对照组,与辛艳^[11]、WYMAN 等^[12]的研究结果相一致,提示 miR-200 家族在上皮性卵巢癌的发病机制中发挥着重要的作用。

近年来,有研究发现细胞外基质(ECM)退化提示卵巢癌浸润正常组织并触发转移^[13]。基质金属蛋白酶(MMPs)是能够降解基底膜和细胞外基质的主要成分,而 MMP-9 主要降解细胞外基质中 IV 型胶原,从而破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,促进细胞转移^[14-15]。由于在侵袭试验中,低表达 miR-200b 的卵巢癌细胞穿过小室的能力明显降低。为进一步探讨 miR-200b 影响卵巢癌细胞侵袭能力的机制,本研究检测低表达 miR-200b 卵巢癌细胞中 MMP-9 的表达情况,结果表明,低表达 miR-200b 后,卵巢癌细胞 MMP-9 的 mRNA 和蛋白水平均显著降低,提示 miR-200b 调节卵巢癌细胞侵袭可能与 MMP-9 表达相关。

综上所述,上皮性卵巢癌患者高表达 miR-200b 可能通过影响上皮性卵巢癌细胞的侵袭功能参与上皮性卵巢癌的进展,血浆 miR-200b 可能成为预测上皮性卵巢癌预后的标志物。本研究为 miR-200b 与上皮性卵巢癌相互关系及其发病机制研究提供新的思路。

参 考 文 献:

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] HALKIA E, SPILLOTIS J. The role of cytoreductive surgery and HIPEC in epithelial ovarian cancer[J]. J BUON, 2015, 20(1): 12-28.
- [3] WANG B, LIU S Z, ZHENG R S, et al. Time trends of ovarian cancer incidence in China[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(1): 191-193.
- [4] WANG X, MENG X, LI H, et al. MicroRNA-25 expression level is an independent prognostic factor in epithelial ovarian cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2014, 16(11): 954-958.
- [5] JIN M, YANG Z, YE W, et al. MicroRNA-150 predicts a favorable prognosis in patients with epithelial ovarian cancer, and inhibits cell invasion and metastasis by suppressing transcriptional repressor ZEB1[J]. PLoS one, 2014, 9(8): e103965.
- [6] CHEN Y F, DONG Z, XIA Y, et al. Nucleoside analog inhibits microRNA-214 through targeting heat-shock factor 1 in human epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Sci, 2013, 104(12): 1683-1689.
- [7] WEN K C, SUNG P L, YEN M S, et al. MicroRNAs regulate several functions of normal tissues and malignancies[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2013, 52(4): 465-469.
- [8] 刘佳宇, 赵妍蕊, 张丽娜, 等. 上皮源性卵巢癌中 4 种 miRNAs 的表达及其临床意义[J]. 天津医药, 2015, 43(9): 996-999.
- [9] HUMPHRIES B, YANG C. The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy[J]. Oncotarget, 2015, 6(9): 6472-6498.
- [10] IORIO MV, VISIONE R, LEVA G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer[J]. J Cancer Res, 2007, 67(18): 8699-8707.
- [11] 辛艳. miRNA-200b 在上皮性卵巢癌中作用的初探[D]. 哈尔滨医科大学, 2014.
- [12] WYMAN S K, PARKIN R K, MITCHELL P S, et al. Repertoire of microRNAs in epithelial ovarian cancer as determined by next generation sequencing of small RNA cDNA libraries [J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5311.
- [13] RAFII A, HALABI N M, MALEK J A. High-prevalence and broad spectrum of cell adhesion and extracellular matrix gene pathway mutations in epithelial ovarian cancer[J]. J Clin Bioinforma, 2012, 2(1): 15.
- [14] ZOU M, ZHANG X, XU C. IL6-induced metastasis modulators p-STAT3, MMP-2 and MMP-9 are targets of 3,3'-diindolylmethane in ovarian cancer cells[J]. Cell Oncol (Dordr), 2016, 39(1): 47-57.
- [15] GHOSH S, BASU M, ROY S S. ETS-1 protein regulates vascular endothelial growth factor-induced matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-13 expression in human ovarian carcinoma cell line SKOV-3[J]. J Biol Chem, 2012, 287(18): 15001-15015.

(张西倩 编辑)