

MiRNA-210 通过 PI3/AKT 信号通路上调 E2F3 促进卵巢癌 SKOV3 细胞增殖作用

张孝艳,赵先兰,周艳,李艳
(郑州大学第一附属医院,河南 郑州 450052)

摘要: [目的] 研究 miRNA-210 是否通过 PI3/AKT 信号通路上调 E2F3 促进卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖作用。[方法] 收集 24 例卵巢癌患者的临床组织。QRT-PCR 分别检测肿瘤组织和癌旁组织中 miRNA-210 的表达;Western blot 检测肿瘤组织和癌旁组织中 AKT、P-AKT、E2F3 表达;CCK-8 检测三组细胞的增殖能力;平板克隆形成实验检测三组细胞的克隆形成能力;裸鼠皮下荷瘤模型检测三组细胞的成瘤能力。[结果] 肿瘤组织中 miRNA-210 的表达高于癌旁组织;肿瘤组织中 P-AKT 和 E2F3 的表达高于癌旁组织;转染结束后,三组细胞中过表达载体 miRNA-210 转染 SKOV3 细胞中 miRNA-210 表达明显高于对照组和空白组,而对照组和空白组之间无差异;CCK-8 检测结果显示 miRNA-210 过表达后促进了 SKOV3 细胞增殖;平板克隆形成实验结果显示 miRNA-210 过表达后 SKOV3 细胞克隆形成能力明显增强;裸鼠皮下荷瘤模型结果显示 miRNA-210 过表达后 SKOV3 细胞皮下成瘤能力明显强于对照组和空白组;Western blot 结果显示 miRNA-210 过表达后 P-AKT 和 E2F3 表达增加,但是 miRNA-210 过表达 SKOV3 细胞系中加入 1 μ mol/L Wortmannin 后 E2F3 表达随之下调。[结论] MiRNA-210 通过 PI3/AKT 信号通路上调 E2F3,从而促进卵巢癌 SKOV3 细胞增殖作用。

关键词: miRNA-210;卵巢肿瘤;SKOV3;PI3/AKT

中图分类号:R737.31 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2019)10-0792-05

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2019.10.A013

MiRNA-210 Promotes Proliferation of Ovarian Cancer SKOV3 Cells by Up-regulating E2F3 via PI3/AKT Signaling Pathway

ZHANG Xiao-yan, ZHAO Xian-lan, ZHOU Yan, LI Yan

(The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of miRNA-210 on proliferation of ovarian cancer SKOV3 cells and its molecular mechanism. [Methods] The tumor tissue samples of 24 patients with ovarian cancer were collected. QRT-PCR was used to detect the expression of miRNA-210 in tumor tissues and adjacent tissues. Western blot was used to detect the expression of AKT, P-AKT and E2F3 in tumor tissues and pericancerous tissues. Ovarian cancer SKOV3 cells were transfected with recombinant miRNA-210 vector(miRNA-210 group) and blank plasmid(blank group), respectively. The clone formation ability of untransfected SKOV3 cells (control group), miRNA-210 group and blank group was detected by plate clone formation assay; the proliferation of three groups of cells was detected by CCK-8. The SKOV3 cells of control group, miRNA group and blank group were inoculated subcutaneously in nude mice and the tumorigenic ability was examined. [Results] The expression of miRNA-210 in tumor tissues was higher than that in adjacent tissues. The expression of P-AKT and E2F3 in tumor tissues was higher than that in adjacent tissues. The expression of miRNA-210 in SKOV3 cells of miRNA-210 group was significantly higher than that in the control group and the blank group, but there was no difference between the control group and the blank group. The CCK-8 test showed that the proliferation of SKOV3 cells in miRNA-210 group was promoted. Plate clone formation assay showed that the cloning ability of SKOV3 cells was significantly enhanced after transfected with miRNA-210. The tumorigenic ability of SKOV3 cells in miRNA-210 group was significantly stronger than that of other two groups. Western blot analysis showed that the expression of P-AKT and E2F3 in SKOV3 cells was increased after transfection of miRNA-210, but the expression of E2F3 was reduced after treated with 1 μ mol/L Wortmannin. [Conclusion] MicroRNA-210 can promote the proliferation of ovarian cancer SKOV3 cells, which is associated with the up-regulation of E2F3 via PI3/AKT signaling pathway.

Key words: miRNA-210; ovarian neoplasms; SKOV3; PI3/AKT

收稿日期:2018-09-19;修回日期:2019-06-12

基金项目:河南省科技攻关计划项目(132102310145)

通信作者:张孝艳, E-mail: feczhangxy@zzu.edu.cn

卵巢癌是女性常见的三大恶性肿瘤之一,死亡率居妇科恶性肿瘤首位^[1]。RNA在生物体中广泛存在并具有重要生物学作用^[2]。近年来研究发现小分子RNA(miRNA)参与了基因转录或转录后调控,在肿瘤发生机制中起重要作用,这一发现打开了肿瘤研究的新领域^[3-4]。MiRNA通过与靶mRNA特定碱基配对引起对靶mRNA的降解、抑制或活化其翻译,可参与多种调节途径,包括细胞分化、细胞增殖凋亡、生殖,以及肿瘤发病机制等^[5]。不同miRNA发挥着癌基因或抑癌基因的作用,和其他类型肿瘤一样,卵巢癌miRNA的表达也有其特殊的异常^[6-7]。本课题拟通过检测卵巢癌组织中miRNA-210的表达情况,揭示其与卵巢癌发病的关系,采用体外实验及动物体内试验,构建miRNA-210真核表达载体并稳定转染人卵巢癌细胞系SKOV3为试验细胞株,首次研究miRNA-210对SKOV3细胞增殖作用的影响及其可能的分子机制,为miRNA-210作为临床卵巢癌治疗靶点提供依据。

1 资料与方法

1.1 患者来源

本次研究共纳入本院2017年12月至2018年4月收治的24例卵巢癌患者,所有患者均未经过任何治疗,所有卵巢癌患者均经过病理检验科诊断证实。实验方法和目的均告知患者和家属,并签署知情同意书,研究获医院伦理委员会批准。

1.2 材料

SKOV3细胞购自中科院上海细胞库,过表达载体miRNA-210由上海吉凯提供,蛋白定量试剂盒、SDS凝胶试剂盒、细胞裂解液、结晶紫均购自武汉碧天根生物有限公司,蛋白酶抑制剂购自罗氏试剂生物有限公司,高糖DMEM培养基、优级胎牛血清、胰蛋白酶消化液均购自美国HyClone,青链霉素混合液、4%多聚甲醛购自北京碧云天有限公司,PGDH、PGE2、Twist抗体购自英国Abcam,ECL化学发光试剂盒购自美国Advansta,兔二抗购自英国Abcam,Trans-well小室购自康宁。

1.3 方法

1.3.1 QRT-PCR

取患者肿瘤组织液氮冷冻,随后进行碾磨,严格按照产品说明书的步骤进行总RNA提取、逆转录和

PCR,取1μg RNA反转录成cDNA。设计microRNA-210和β-actin上下游引物,PCR循环条件:95℃ 30s预变性,95℃ 5s,60℃ 30s共40个循环。

1.3.2 过表达载体miRNA-210转染SKOV3细胞

SKOV3细胞培养于含10%FBS和1%青链霉素的高糖DMEM培养液中,置于37℃/5% CO₂的培养箱内。细胞稳定传代3次后,接种到6孔板中,每孔细胞密度为4×10⁵个。24h后(汇合度约60%) miRNA-210重组载体和miRNA-NC空质粒按试剂盒操作说明进行转染,每孔转染试剂Lipofectamine 2000 5μl,质粒2.5μg,转染24h后QRT-PCR检测miRNA-210表达效果。

1.3.3 平板克隆形成实验

对数生长期细胞,胰蛋白酶消化,计数,300个细胞/2ml/6孔板,37℃孵箱培养15d,显微镜下观察克隆形成数量,结晶紫染色,克隆形成计数。

1.3.4 Western blot

细胞计数以1×10⁶个细胞/ml的细胞数种到6孔板中,设3个复孔。细胞贴壁取出6孔板,弃掉上清;PBS清洗1min后加含有蛋白酶抑制剂的裂解液并吹打细胞团,后放置冰上裂解,30min后用细胞刮将细胞刮下来转移至1.5ml试管中,高速离心并抽取上清,即为所提蛋白。取患者肿瘤组织液氮冷冻,随后进行碾磨,裂解液裂解,低温离心取上清,即为组织蛋白。蛋白定量完成后加上样缓冲液,沸水煮5min,样品可冻于-80℃保存。SDS-PAGE电泳后进行转膜操作,转膜成功后用脱脂牛奶进行封闭,PB-ST清洗,裁剪条带并分别加入相应抗体,均为1:1000稀释,室温孵育1h后4℃过夜。次日反复清洗条带,加二抗室温孵育90min,PBS反复冲洗,然后加ECL发光液,化学发光仪检测并拍照。

1.3.5 裸鼠皮下荷瘤模型

4周雄性裸鼠,对照组、空白组和过表达组各6只随机分组,7d后,将对数生长期SKOV3、miRNA-NC-SKOV3、miRNA-210-SKOV3细胞用胰蛋白酶消化液消化,计数,调整密度为每只裸鼠5×10⁶个/200μl,混匀在无血清DMEM培养液,分别接种至三组裸鼠皮下。7d后裸鼠皮下成瘤,之后每隔3d用游标卡尺测1次移植瘤长径(a)和短径(b),并计算肿瘤体积(V)=ab²/2,绘制肿瘤生长曲线。裸鼠实验遵循动物保护和做好动物福利规定,并经实验动物伦理委员会批准。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理,连续变量以“均数±标准差”表示,采用配对 *t* 检验、独立样本 *t* 检验和单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌患者肿瘤组织和癌旁组织中 miRNA-210、P-AKT 和 E2F3 表达分析

QRT-PCR 结果显示卵巢癌患者肿瘤组织 miRNA-210 表达明显高于癌旁组织 ($t=4.391, P=0.002$)。Western blot 检测结果显示 PI3/AKT 信号通路激活标志蛋白 P-AKT 在肿瘤组织表达明显高于癌旁组织 ($F=128.7, P<0.001$); 同样 E2F3 表达明显高于癌旁组织 ($F=94.09, P<0.001$) (Figure 1)。

2.2 QRT-PCR 检测三组 SKOV3 细胞 miRNA-210 的表达

QRT-PCR 检测结果显示 miRNA-210-SKOV3 细胞中 miRNA-210 表达水平明显高于对照组和空白组 ($F=43.930, P<0.001$), 而空白组和对照组之间

无差异 ($F=0.377, P=0.697$) (Figure 2)。

2.3 CCK-8 检测三组细胞增殖能力分析

CCK-8 实验结果显示,miRNA-210 表达后细胞增殖能力明显强于对照组和空白组 ($F=123.870, P<0.001$), 而空白组和对照组之间无差异 ($F=0.873, P=0.097$) (Figure 3)。

2.4 MiRNA-210 过表达后对 SKOV3 细胞平板克隆形成能力影响

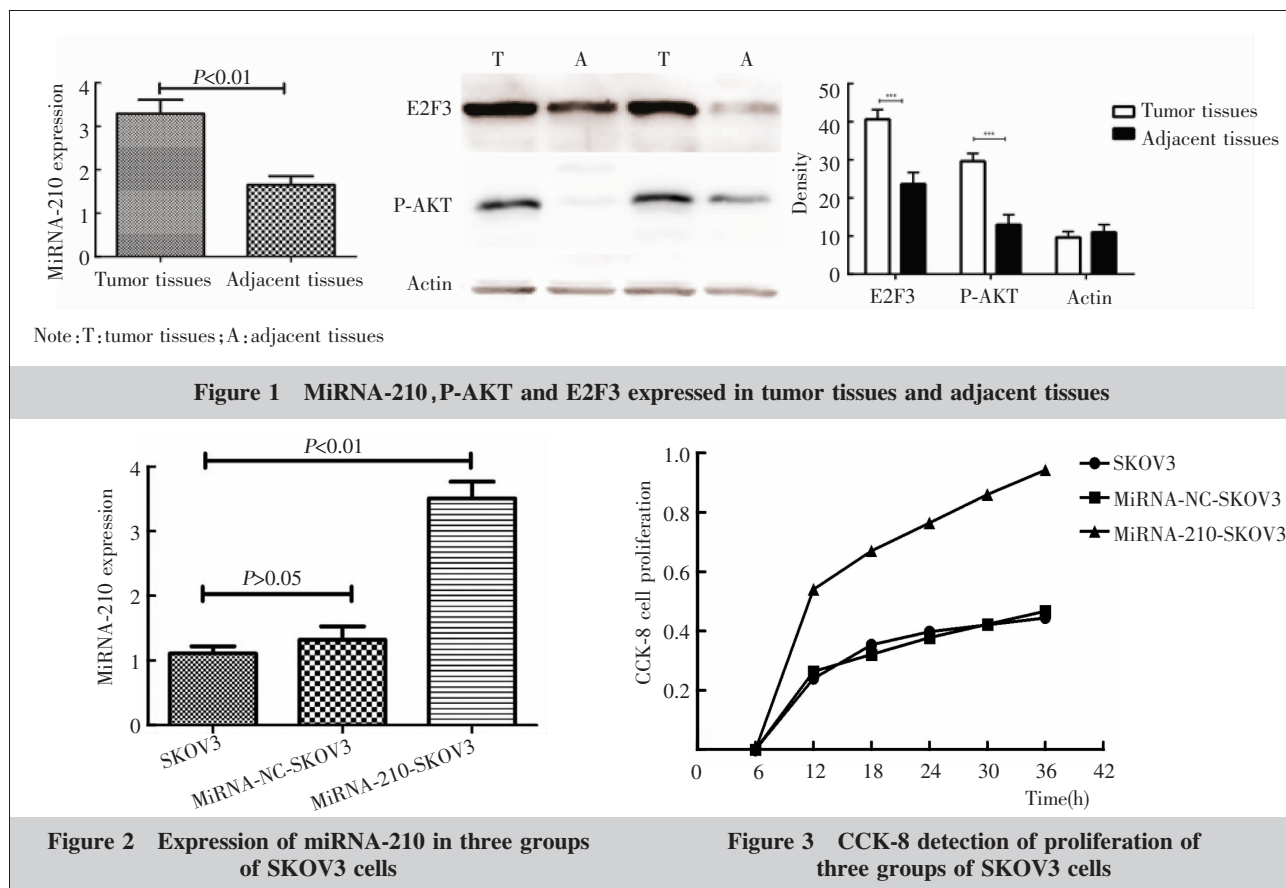
平板克隆形成实验结果表明, 过表达 miRNA-210 后 SKOV3 细胞克隆形成能力明显强于对照组和空白组 ($F=371.2, P<0.001$), 而空白组和对照组之间无差异 ($F=0.333, P=0.729$) (Figure 4)。

2.5 MiRNA-NC-SKOV 和 miRNA-210-SKOV3 细胞裸鼠皮下成瘤能力分析

裸鼠皮下荷瘤模型结果显示,miRNA-210 过表达后 SKOV3 细胞裸鼠皮下成瘤能力明显强于空白组 ($t=11.38, P=0.003$) (Figure 5)。

2.6 MiRNA-210 在 SKOV3 细胞过表达后对 P-AKT、E2F3 表达分析

Western blot 结果显示在 SKOV3 细胞过表达



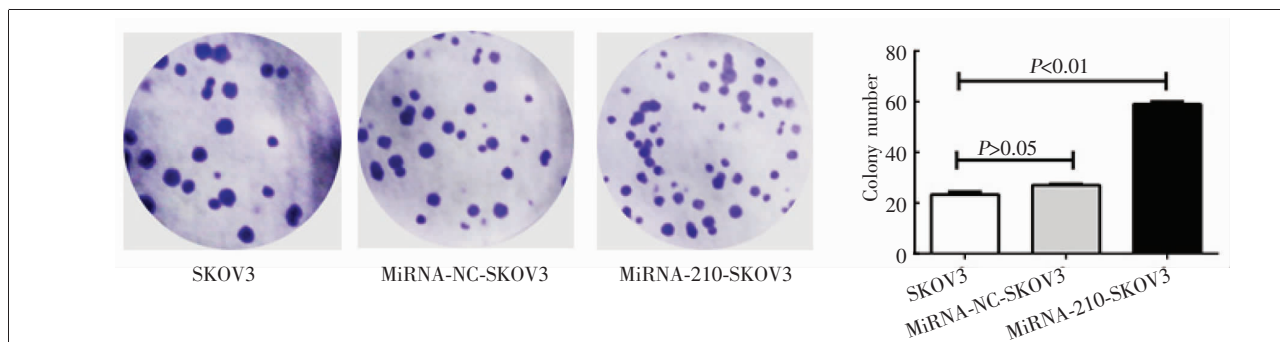


Figure 4 Effect of miRNA-210 up-regulation on the ability of SKOV3 cell clone formation

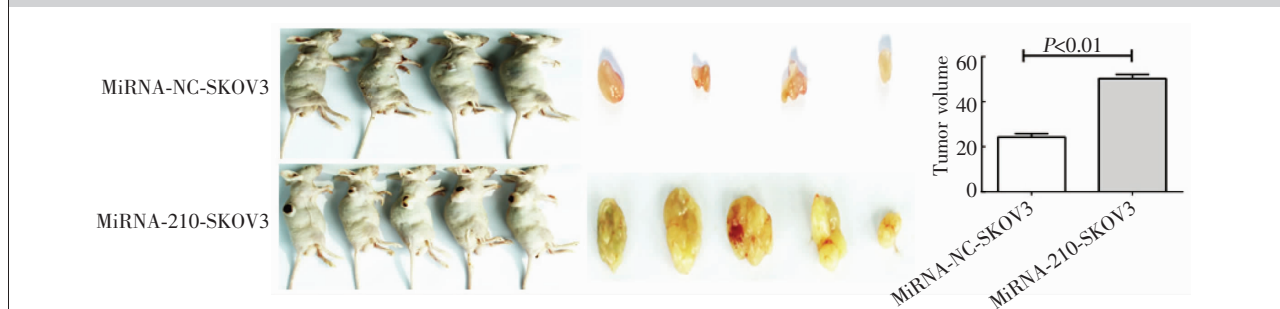


Figure 5 Effect of up-regulation of miRNA-210 on subcutaneous tumorigenic ability of SKOV3 cells

miRNA-210 后, P-AKT 和 E2F3 表达均上调 ($F=51.65, P<0.001$); 当 miRNA-210-SKOV3 细胞用 $1\mu\text{mol/L}$ Wortmannin 处理后, P-AKT 表达降低而 E2F3 表达也随之降低 ($F=118.9, P<0.001$) (Figure 6)。

3 讨 论

文献报道67%的卵巢癌患者诊断时已属进展期,肿瘤已发生广泛的腹腔或远处转移,且5年存活率仍较低,徘徊在25%~30%,卵巢癌已成为目前严重威胁女性生命的恶性肿瘤^[8-9]。目前,对卵巢癌发病机制和诊断治疗策略的研究越来越受到重视,抑

癌基因的失活和癌基因的激活可能是本病的主要发病原因^[10]。近年来发现miRNA可能发挥着抑癌基因或癌基因的作用,许多研究表明,在多种肿瘤细胞中存在着多种miRNA表达的上调或下调,与肿瘤的发生发展有着密切的关系^[11]。MiRNA是一种内源性非编码小分子RNA,其对基因具有一定的调控功能,miRNA可以与相对应的mRNA不完全甚至完全配对互补,最终导致mRNA的翻译修饰或者降解,从而在转录水平对基因表达进一步的控制^[12]。MiRNA的数量很多,目前已经发现的就多达16772种,占整个基因组总数的30%,因此miRNA已经成为最大的基因调控家族。多数的miRNA的靶基因都参与了

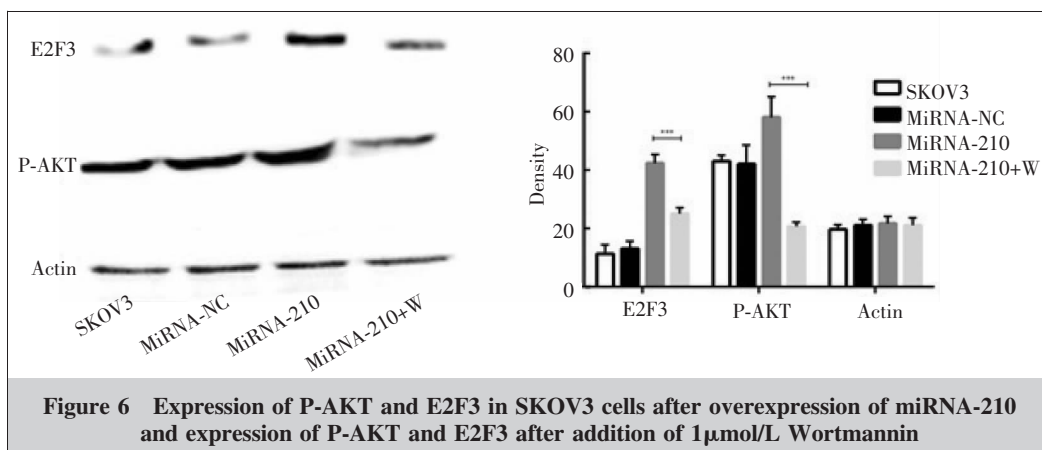


Figure 6 Expression of P-AKT and E2F3 in SKOV3 cells after overexpression of miRNA-210 and expression of P-AKT and E2F3 after addition of $1\mu\text{mol/L}$ Wortmannin

蛋白转录、信号转导和肿瘤发生的过程,有研究表明miRNA能够调节Ras信号通路、干细胞分布等作用^[13-15],因此miRNA的作用目标靶点和活性机制一直是科研人员关注的热点。

研究发现miR-

NA-210 在缺氧处理下的卵巢癌细胞内异常兴奋,并且体外研究发现其可以下调 E2F3 蛋白水平^[16],E2F3 是一种细胞周期关键蛋白,是一种重要的细胞周期调控因子,参与体内主要两条细胞增殖调节和肿瘤监控途径的表达^[17]。此研究同时表明卵巢癌患者 miRNA-210 基因拷贝数被大幅删减,并直接导致其表达水平降低^[18]。由此可知,miRNA-210 与 E2F3 蛋白水平表达密切相关,其在卵巢癌细胞增殖过程中起到重要的作用,是卵巢癌发生的病理基础。

本研究首次研究了 miRNA-210 和 E2F3 与 SKOV3 细胞增殖作用之间的关系,并深入探究了其可能的分子机制,即 miRNA-210 是否通过 PI3/AKT 信号通路与 E2F3 和 SKOV3 细胞增殖作用之间产生关系。本研究首先检测了卵巢癌患者肿瘤组织和癌旁组织中 miRNA-210、P-AKT 和 E2F3 表达,分析结果显示卵巢癌患者肿瘤组织 miRNA-210、P-AKT 和 E2F3 表达均明显高于癌旁组织;接着构建 miRNA-210 真核表达载体并稳定转染人卵巢癌细胞系 SKOV3,成功构建 miRNA-210 过表达细胞系;细胞系构建成功后检测了细胞的增殖能力,CCK-8 实验结果显示 miRNA-210 表达后细胞增殖能力明显强于对照组和空白组,平板克隆形成实验和裸鼠皮下荷瘤模型结果与此相同。最后研究了 miRNA-210 过表达后对 AKT、P-AKT、E2F3 表达影响,Western blot 结果显示在 SKOV3 细胞过表达 miRNA-210 后,P-AKT 和 E2F3 表达均上调,但是使用 PTEN 处理 miRNA-210-SKOV3 细胞,E2F3 表达随着 P-AKT 降低。

综上所述,本研究发现 miRNA-210 在卵巢癌可以通过 PI3/AKT 信号通路上调 E2F3 促进癌细胞的增殖,这为临床上卵巢癌的治疗提供可靠的分子靶点,同时为卵巢癌的治疗提供了新的治疗方案和思路。

参考文献:

- [1] Li J,Wu MF,Lin ZQ. FIGO gynecological cancer,2018-guideline interpretation of ovarian cancer,fallopian tube cancer and peritoneum cancer treatment[J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics,2019,35(3):304-314.[李晶,吴妙芳,林仲秋.《FIGO 2018 妇癌报告》——卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌诊治指南解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2019,35(3):304-314.]
- [2] Mitchell PS,Parkin RK,Kroh EM,et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2017,105(30):10513-10518.
- [3] Lyu XF,Hong HQ,Cui SH,et al. Effects of microRNA-451 expression on proliferation ability and apoptosis of ovarian cancer cells [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology,2018,34(9):1095-1099.[吕晓峰,洪汉卿,崔世红,等. 微小 RNA-451 表达对卵巢癌细胞增殖能力及凋亡水平的影响 [J]. 中国临床药理学杂志,2018,34(9):1095-1099.]
- [4] Zhao XH,Liu ZY,Mao HN. Long-chain non-coding RNA H19 targeting miR-141 regulates migration and invasion of ovarian cancer cells [J]. Chinese Journal of Immunology,2018,34(9):1349-1353.[赵雪卉,刘宗印,毛红妮. 长链非编码 RNA H19 靶向 miR-141 调控卵巢癌细胞的迁移和侵袭行为[J]. 中国免疫学杂志,2018,34(9):1349-1353.]
- [5] Kong W,Wang HM,Wang SQ. Construction of ovarian cancer regulatory network based on miRNA-mRNA combined analysis [J]. Genomics and Applied Biology,2018,37(9):4227-4233.[孔薇,王慧敏,王帅群. 基于 miRNA-mRNA 联合分析的卵巢癌调控网络构建[J]. 基因组学与应用生物学,2018,37(9):4227-4233.]
- [6] Peng Y,Croce CM. The role of microRNAs in human cancer [J]. Signal Transduct Target Ther,2016,1:15004.
- [7] Ohtsuka M,Ling H,Doki Y,et al. MicroRNA processing and human cancer[J]. Clin Med,2015,4(8):1651-1667.
- [8] Zhang SS,Xia QM,Zheng RS,et al. Incidence and mortality of ovarian cancer in China,2010 [J]. China Cancer,2016,25(3):169-173.[张爽爽,夏庆民,郑荣寿,等. 中国 2010 年卵巢癌发病与死亡分析 [J]. 中国肿瘤,2016,25(3):169-173.]
- [9] Zhang H,Liu T,Zhang Z,et al. Integrated proteogenomic characterization of human high-grade serous ovarian cancer[J]. Cell,2016,166(3):755-765.
- [10] Jung H,Lee D,Lee J,et al. Intron retention is a widespread mechanism of tumor-suppressor inactivation[J]. Nat Genet,2015,47(11):1242.
- [11] Moridikia A,Mirzaei H,Sahebkar A,et al. MicroRNAs: Potential candidates for diagnosis and treatment of colorectal cancer[J]. J Cell Physiol,2018,233(2):901-913.
- [12] Beckman M.MicroRNA found cavorting with p53[J]. J Natl Cancer Inst,2017,99(22):1664-1665.
- [13] Wang YY,Huang X,Wang YY,et al. MiRNA-15a suppresses ovarian cancer cell proliferation and metastasis by targeting Wnt3a and regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology,2018,45(14):712-716.[王雨艳,黄鑫,王琰琰,等. miRNA-15a 通过靶向 Wnt3a 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制卵巢癌的发展和转移 [J]. 中国肿瘤临床,2018,45(14):712-716.]
- [14] Mlcochova J,Faltejskova-Vychytilova P,Ferracin M,et al. MicroRNA expression profiling identifies miR-31-5p/3p as associated with time to progression in wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with cetuximab [J]. Oncotarget,2015,6(36):38695.
- [15] Ma HB,Li HF. Research progress on MicroRNA in early diagnosis and prognosis of ovarian cancer [J]. Chinese Journal of General Practice,2018,16(5):826-829.[马瀚博,李怀芳. MicroRNA 在卵巢癌早期诊断及预后中应用的研究进展[J]. 中华全科医学,2018,16(5):826-829.]
- [16] Nakashima S,Jinnin M,Kanamaru H,et al. The role of miR-210,E2F3 and ephrin A3 in angiosarcoma cell proliferation[J]. Eur J Dermatol,2017,27(5):464-471.
- [17] Bian WS,Shi PX,Mi XF,et al. MiR-210 protects cardiomyocytes from OGD/R injury by inhibiting E2F3 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2018,22:743-749.
- [18] Dang K,Myers K. The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression[J]. Int J Mol Sci,2015,16(3):6353-6372.