

MiRNA-22 在不同分期浆液性卵巢腺癌中的表达以及与化疗药物耐药性关系的研究

余东阳,张申华,韩丽蓉,郭飞波

(天门市第一人民医院,湖北 天门 431700)

摘要: [目的] 探讨 miRNA-22 在不同分期浆液性卵巢腺癌的表达以及与化疗耐药性关系。 [方法] 使用基因芯片技术筛选出差异化表达的 miRNA,再用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 miRNA-22 在人卵巢癌细胞株(SKOV3)、紫杉醇稳定耐药卵巢浆液性囊腺癌细胞亚株(SKOV3-TR30)、人正常卵巢上皮细胞株(IOSE80)及 50 例确诊为浆液性卵巢腺癌的患者、25 例正常人血清中的表达水平,并分析其与患者临床分期的关系以及用药前后的关系。 [结果] miRNA-22 在 SKOV3-TR30 耐药株中的表达明显高于 SKOV3 敏感株中的表达水平($P<0.05$),IOSE80 正常卵巢上皮细胞株中 miRNA-22 的表达水平明显低于 SKOV3 敏感株($P<0.05$);在 FIGO 手术病理不同分期中的表达,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期表达水平依次增高;经统一的化疗方案治疗后,化疗无效组的表达水平高于化疗有效组的表达水平($P<0.05$)。 [结论] miRNA-22 可能是卵巢癌患者潜在的肿瘤标志物,miRNA-22 的高表达可能与癌细胞的过度增殖与转移、侵袭有关,具有癌基因与抑癌基因的双侧作用,且可能与化疗药物的耐药性密切相关。

关键词: 卵巢肿瘤;腺癌;miRNA-22;耐药;药物疗法

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)12-0993-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.12.B003

Expression of MiRNA-22 in Serous Ovarian Adenocarcinoma of Different Stages and Its Relation to Chemotherapy Drug Resistance

YU Dong-yang, ZHANG Shen-hua, HAN Li-rong, et al.

(The First People's Hospital of Tianmen, Tianmen 431700, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of miRNA-22 in serous ovarian adenocarcinoma of different stages and its relation to chemotherapy drug resistance. [Methods] The differential expression of microRNA was screened using the gene chip technique, and then RT-PCR was used to detect the expression of miRNA-22 in ovarian cancer SKOV3 and SKOV3-TR30, normal ovarian epithelial IOSE80 cells and in serum of 50 patients with serous ovarian adenocarcinoma and 25 healthy women. The correlation of miRNA-22 expression with serous ovarian adenocarcinoma of different stages was analyzed before and after treatment. [Results] The expression of miRNA-22 in chemoresistant SKOV3-TR30 cells was significantly higher than that in sensitive SKOV3 cells($P<0.05$), and the expression in normal ovarian epithelial IOSE80 cells was significantly lower than that in the SKOV3 sensitive cells ($P<0.05$). The expression of miRNA-22 in different FIGO surgical-pathological stages was increased from stage I, II, III to stage IV. After treatment with the unified chemotherapy regimens, the expression level in non-response group was higher than that in response group($P<0.05$). [Conclusion] MiRNA-22 might be a potential tumor marker in patients with ovarian cancer, the high expression of miRNA-22 may be closely related to excessive proliferation and metastasis, invasion of serous ovarian adenocarcinoma cells, and it also may be closely related to the chemotherapy drug resistance.

Subject words: ovarian neoplasms; adenocarcinoma; miRNA-22; drug resistance; drug therapy

近年来的研究表明,miRNA 作为肿瘤抑癌基因

或致癌基因来调节 mRNA 的转录和功能,在肿瘤的发生、发展和凋亡,以及在肿瘤的血管形成方面起到重要的调节作用^[1],miRNA 的异常表达不仅与肿瘤的分型、细胞形态学亚型、癌细胞的发生转移有

通讯作者: 余东阳,主管技师,硕士;湖北省天门市第一人民医院检验科,湖北省天门市竟陵街道人民大道东 1 号 (431700);E-mail: 535963252@qq.com

收稿日期: 2016-06-23; **修回日期:** 2016-07-27

关,还与多种肿瘤的耐药及预后密切相关^[2-4],其机制区别于siRNA介导的mRNA降解。研究发现miRNA在卵巢癌中出现多种miRNA分子表达的上调与下调,因此miRNA在卵巢癌中发挥关键作用。本课题组采用基因芯片技术发现浆液性卵巢癌患者中差异性表达的miRNA-22分子,再通过体外细胞实验观察人卵巢癌细胞株(SKOV3)、紫杉醇稳定耐药卵巢浆液性囊腺癌细胞亚株(SKOV3-TR30)、人正常卵巢上皮细胞株(IOSE80)中miRNA-22的表达情况及50例确诊为浆液性卵巢腺癌的患者与25例正常人血清miRNA-22的表达特点,进一步探讨miRNA-22与卵巢癌的形态学亚型及化疗药物耐药性的关系。

1 资料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人卵巢癌细胞紫杉醇敏感株(SKOV3)、紫杉醇稳定耐药卵巢浆液性囊腺癌细胞亚株(SKOV3-TR30)细胞由华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学实验室惠赠;人正常卵巢上皮细胞株(IOSE80)(上海拜力生物科技有限公司),McCOY'5A常规培养基、DMEM/F12(1:1)(均为美国Hyclone公司),胎牛血清(美国Gibco公司),紫杉醇(德国Sigma公司),Trizol试剂(美国Invitrogen公司),逆转录试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司),实时荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司),Gene Pix 4000B芯片扫描仪(美国Axon公司)。

1.2 患者资料

50例卵巢癌患者血清由天门市第一人民医院检验科保存,该50份血清标本选自2015年1月至2016年1月在天门市第一人民医院肿瘤科3个病区住院的50例浆液性卵巢腺癌患者,年龄(53±12)岁;所有患者均经病理学确诊,并按FIGO分期分为I期6例,II期6例,III期22例,IV期16例;另选同期在本院体检中心就诊的正常妇女血清标本25例作为对照组,年龄分布为(52±10)岁;所有患者采样前均未接受放化疗、免疫治疗,且未并发其它恶性肿瘤、未发生严重感染。入选的人群均经本人知情同意,签署同意后,并通过医院伦理委员会审查。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

SKOV3在McCOY'5A常规培养基中培养、传代,SKOV3-TR30持续在含有紫杉醇的McCOY'5A常规培养基中培养、传代、冻存。IOSE80细胞常规悬浮含10%胎牛血清的DMEM/F12(1:1)培养基中,在37℃、5%CO₂条件下培养。每种细胞株传代16瓶,在细胞状态较好时进行实验。

1.3.2 miRNA基因芯片技术进行差异化表达分析

每位入选者采取5ml肘静脉血,在60min内通过高速离心分离,再将分离得到的上层血清样本转移至1.5ml离心管,13 000g离心2min,收集上清液。1号混合血清:随机(n=3)3次分别选取其中5例晚期卵巢癌患者(III期、IV期)的血清等量混合(因miRNA在不同类型的肿瘤患者中既存在高表达也存在低表达,但是同一种miRNA分子在同一种肿瘤患者中的表达一般会有一定的表达谱,不同的肿瘤分期在未采取临床干预措施下,一般不会改变其表达趋势,实验基于这一假设而设计);2号混合血清:随机(n=3)选取5例正常人的血清等量混合。用LC Sciences基因芯片分别对1号和2号混合血清进行3次独立检测,再用激光扫描仪(Gene Pix 4000B)进行图像采集,用Array-Pro图像分析软件进行图像数字化转换。两份混合血清中miRNA的差异化表达定义为:同一检测指标,高值≥2倍低值,定义为差异表达(该筛选实验由深圳华大基因公司完成)。后续实验选择混合血清中差异表达上调最明显的miRNA-22作为研究对象。

1.3.3 血清中RNA的提取和cDNA的合成

用Trizol法提取标本中的总RNA,再取100ng的RNA用反转录试剂盒合成cDNA(miRNA-22含有茎环结构的逆转录引物由深圳华大基因合成,引物序列:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAGTT-3'),反应体系:总RNA 5μl,miRNA-22 RT引物 1.8μl,U6 RT引物 1.8μl,dNTP 5μl,5xM-MLV逆转录缓冲液 6μl,逆转录酶 0.25μl,RNA酶抑制剂 0.6μl,补DEPC水至30μl。反应条件:16℃ 30min,42℃ 45min,85℃ 2min。

1.3.4 实时荧光定量PCR检测miRNA-22的表达

检测SKOV3、SKOV3-TR30、IOSE80、50例患者及25例对照组的miRNA-22的表达水平,观察3种细胞株中miRNA-22的表达差异,观察患者与对照

组 miRNA-22 的表达差异,以及化疗有效组与化疗无效组间 miRNA-22 表达的差异。

采用逆转录试剂盒检测 miRNA-22 的表达,引物序列:miRNA-22 上游引物:5'-AAGCTGCCAGT-TGAAGAACTGTA-3',下游引物:5'-GCTGTCAACGAT-ACGCTAC-GTAAC-3',内参 U6 上游引物:5'-CGCTTCGGCAGCACATATA-3',内参 U6 下游引物:5'-TTCACGAATTTGCGTGTCTAT-3',引物序列均由深圳华大基因合成。PCR 反应体系:cDNA 2μl、上下游引物各 0.4μl、2×SYBR10μl 混合,再加入 DEPC 水至 20μl。反应条件:95℃预变性 10min,再 95℃变性 30s,再 60℃退火延伸 30s,共 40 个循环,每个标本做 3 个复孔,目的基因的相对表达水平以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。

1.3.5 治疗方案

新辅助化疗 4~8 周后,行肿瘤细胞减灭术(PDS),术后辅以铂类药物为主的化疗。①新辅助化疗:TP 方案(紫杉醇+顺铂),疗程≥3,紫杉醇 135mg/m²,顺铂 80mg/m²,新辅助化疗 1~2 个月,行肿瘤细胞减灭术。②肿瘤细胞减灭术:尽可能切除肿瘤组织,使残留病灶最大直径≤2cm,依次切除子宫、大网膜、双附件,进行盆腔淋巴结清扫,切除阑尾,再进行腹主动脉旁淋巴结清扫。必要时可进行膀胱及肠道部分切除术。③术后化疗:肿瘤细胞减灭术后采取 TC(紫杉醇+卡铂)/TP 方案进行化疗。TC/TP 方案药物用量:紫杉醇 150mg/m²,卡铂曲线下面积 (area under curve,AUC)5.0/顺铂 70mg/m²,每 3 周进行 1 次化疗,疗程≥3。根据 WHO 客观疗效评价标准^[5]将化疗效果分为:完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SD)、进展(PD),其中化疗有效=CR+PR,化疗无效=SD+PD。

1.4 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析,所有计量资料用($\bar{x}\pm s$)表示,采用单样本 K-S 法正态性检验,均呈正态分布;组内比较采用配对 *t* 检验,组间比较采用独立样本 *t* 检验,检验水准 *P*<0.05,为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组混合血清中差异化表达的 miRNA 种类比较

结果显示,肿瘤组差异化表达增高的前 5 类

miRNA 依次为:miRNA-22、miRNA-93、miRNA-4492、miRNA-2861、miRNA-21;肿瘤组差异化表达降低的前 5 类 miRNA 依次为:miRNA-99b、miRNA-let-7a、miRNA-4267、miRNA-122-5P、miRNA-199a (Table 1)。

Table 1 The results of differential expression of miRNAs in two mixed serum

Differentially expressed miRNAs	No. 1 mixed serum expression quantity	No. 2 mixed serum expression quantity	Differential expression fold*
Higher expression			
miRNA-22	6.55	0.87	+7.53
miRNA-93	10.20	1.66	+6.14
miRNA-4492	8.28	1.51	+5.48
miRNA-2861	6.40	1.25	+5.12
miRNA-21	9.26	2.20	+4.21
Lower expression			
miRNA-99b	1.07	7.55	-7.06
miRNA-let-7a	0.93	6.24	-6.71
miRNA-4267	1.62	9.55	-5.90
miRNA-122-5P	1.79	6.81	-3.84
miRNA-199a	4.93	11.35	-2.30

Note: "+"represents differential expression increased compared with normal group; "-"represents differential expression reduced compared with normal group.

2.2 3 种细胞株中 miRNA-22 的相对表达量的比较

不同细胞株组间 miRNA-22 水平比较结果显示,各组间存在差异,其中敏感株与耐药株的水平均高于正常对照组,差异具有统计学意义(*P*<0.05);耐药株的表达水平明显高于敏感株,差异具有统计学意义(*P*<0.05)(Table 2)。

Table 2 The relative expression of miRNA-22 in three kinds of cell lines($\bar{x}\pm s$)

Cell lines	N	miRNA-22	<i>t</i>	<i>P</i>
SKOV3	16	2.95±0.71 ^a	<i>t_a</i> = 2.323	<i>P_a</i> =0.025
SKOV3-TR30	16	3.45±0.74 ^b	<i>t_b</i> = -11.361	<i>P_b</i> =0.001
IOSE80	16	1.23±0.24 ^c	<i>t_c</i> = -12.607	<i>P_c</i> =0.001

Note: a:SKOV3 group vs SKOV3-TR30 group, *P* <0.05;b: SKOV3-TR30 group vs IOSE80 group, *P* <0.05;c:SKOV3 group vs IOSE80 group, *P* <0.05.

2.3 卵巢癌患者与正常对照血清中 miRNA-22 的相对表达量的比较

结果显示,卵巢癌患者 miRNA-22 相对表达水平(6.61±1.08)明显高于正常对照组(0.64±0.15)的表达水平,差异具有统计学意义(*t*=-21.879,*P*=0.001)。

2.4 4种不同分期的卵巢癌患者中 miRNA-22的相对表达量比较

Ⅱ期、Ⅲ期、Ⅳ期 miRNA-22 水平均高于Ⅰ期,差异具有统计学意义($P<0.05$);Ⅲ期、Ⅳ期的表达水平明显高于Ⅱ期,差异具有统计学意义($P<0.05$);Ⅳ期的表达水平与Ⅲ期相比,差异无统计学意义($P>0.05$)(Table 3)。

Table 3 The relative expression of miRNA-22 in different stages in patients of ovarian cancer ($\bar{x}\pm s$)

Different stages	N	miRNA-22	<i>t</i>	<i>P</i>
I	6	2.63±0.66	—	—
II	6	4.59±0.95	-6.765 ^a	0.001 ^a
III	22	8.44±0.98	11.273 ^b	0.001 ^b
IV	16	8.88±0.87	-1.340 ^c	0.190 ^c

Note: a: compared with stage I, $P<0.05$; b: compared with stage II, $P<0.05$; c: compared with stage III, $P>0.05$.

2.5 卵巢癌患者化疗前后血清中 miRNA-22的相对表达水平

化疗后,6例Ⅰ期患者均有效,6例Ⅱ期患者均有效,Ⅲ期患者中18例无效,4例有效,Ⅳ期患者中14例无效,2例有效。化疗有效组化疗后 miRNA-22 的相对表达水平明显低于化疗前,差异具有统计学意义($P<0.05$);化疗无效组化疗后 miRNA-22 的相对表达水平与化疗前相比差异无统计学意义($P>0.05$)(Table 4)。

Table 4 The relative expression of miRNA-22 before and after chemotherapy in the patients of ovarian cancer ($\bar{x}\pm s$)

Groups	N	Before chemotherapy	After chemotherapy	<i>t</i> [*]	<i>P</i> [*]
Chemotherapy effective group	18	3.46±0.68	1.94±0.38	-7.794	0.001
Chemotherapy invalid group	32	8.12±1.60	7.78±1.27	0.688	0.497

Note: *: comparison between the group before chemotherapy and after chemotherapy.

3 讨论

目前国内外关于 miRNA 的研究是一个热点领域,miRNA 在人体外周血中稳定的表达,也提示着它可以作为一种新型的肿瘤标志物。其中 miRNA-22 与卵巢癌的研究逐渐引起人们的关注,其在肺腺癌、乳腺癌、结直肠癌中均出现高表达,其中在乳腺癌中具有癌基因与抑癌基因的双重作用,以调节乳腺癌的发生与转移,在淋巴瘤中也有报道^[6];而在卵巢癌中,miRNA-18b、miRNA-21、miRNA-99b 与卵巢

癌的发生较为密切,目前,在国内外的报道中,关于 miRNA-22 是卵巢癌的促癌因素与抑癌因素的研究以及 miRNA-22 与卵巢癌关系的分子机制的研究较为多见^[7,8],但是不同分期的卵巢癌中 miRNA-22 的差异表达与卵巢癌患者对化疗药物的耐药性相关研究较少报道。而肿瘤细胞的耐药性一直伴随着肿瘤药物治疗的过程中。

本研究中细胞水平研究结果显示,miRNA-22 在对紫杉醇耐药的卵巢癌细胞中出现高表达,在正常卵巢癌上皮细胞中出现低表达,而敏感株的卵巢癌细胞的表达量则介于二者之间,提示 miRNA-22 可能通过调控不同的靶基因,使其具有癌基因的作用,参与了癌细胞的发生与发展,因此也提示其可以作为一种新的信号分子用于对卵巢癌的诊断中;个体水平研究显示:50 例患者血清中 miRNA-22 的表达显著高于正常人,这与细胞水平的研究结果是一致的,同时我们也发现,正常人血清中 miRNA-22 水平与卵巢癌上皮细胞 miRNA-22 水平相比也存在差异,这可能是细胞的体内外结果中标本类型不一致以及癌细胞的生存环境差异造成的;通过对不同卵巢癌分期的研究发现,随着病情的进展,miRNA-22 水平也呈现出相应的变化趋势,随着病情的加重,miRNA-22 水平也逐渐增高,在病情进展到Ⅲ期、Ⅳ期时,这种高表达也更为明显,这也可能与该期存在癌细胞的广泛转移与侵袭有关,但是在疾病进展到Ⅳ期后,这种差异性表达逐渐减小,这可能随着病情的迁延,肿瘤细胞的侵袭能力增强有关,据报道^[9],侵袭转移能力强的卵巢癌细胞中 miRNA-22 会出现低表达,推测 miRNA-22 可能具有抑癌基因的作用。通过对化疗后不同患者研究发现,6

例Ⅰ期患者均有效,6例Ⅱ期患者均有效、Ⅲ期患者中18例无效,4例有效,Ⅳ期患者中14例无效,2例有效,说明早期卵巢癌对化疗药物更为敏感,晚期耐药的倾向更为显著。统计发现,化疗有效组在化疗后 miRNA-22 水平显著下降,而化疗无效组在化疗后 miRNA-22 水平与治疗前相比无差异,这可能是 miRNA-22 相关的靶基因与耐药基因密切相关,能够激活这些耐药基因的表达。miR-22 的预测靶基因 RHOC(Ras 同系物家族的基因之一)的表达水平与卵巢癌及肝癌细胞的侵袭转移能力明显相关^[9],miR-

NA-22 在乳腺癌中通过调控靶基因 *RHOC* 的表达,使其具有癌基因和抑癌基因双重作用,调控乳腺癌的发生发展和转移^[10,11]。由此我们可以推测,miRNA-22 可能与卵巢癌耐药的分子机制相关,具有癌基因的作用,过表达的 miRNA-22 通过激活靶基因 *RHOC*,增强了肿瘤细胞的侵袭与转移,从而导致对化疗药物的耐药性。

综上所述,miRNA-22 在正常人中低表达,在卵巢癌患者中高表达,在耐药性卵巢癌患者中高表达,病情越重,表达越高,治疗有效后,表达会降低,但随着病情迁延至晚期,其表达会出现降低的趋势,可以推测该分子具有癌基因和抑癌基因双重作用;其耐药机理可能是过表达的 miRNA-22 通过激活靶基因 *RHOC*,增强了肿瘤细胞的侵袭与转移,从而导致对化疗药物的耐药性。这为我们以后更进一步研究 miRNA-22 与肿瘤耐药机制的研究提供了一个方向,为寻找更有效的卵巢癌基因治疗靶点打下基础。

参考文献:

- [1] Liao W, Liu XD, Peng HX, et al. The expression and functional study of miR-181a in pediatric acute lymphoblastic leukemia[J]. Chinese Journal of Hematology, 2015, 36(1): 53-57. [廖旺, 刘晓丹, 彭红霞, 等. miR-181a 在急性淋巴细胞白血病患者中的表达及其功能研究 [J]. 中华血液学杂志, 2015, 36(1): 53-57.]
- [2] Nordentoft I, Birkenkamp-Demtroder K, Agerbæk M, et al. miRNAs associated with chemo-sensitivity in cell lines and in advanced bladder cancer[J]. BMC Med Genomics, 2012, 5: 40.
- [3] Tian W, Chert J, He H, et al. MicroRNAs and drug resistance of breast cancer: basic evidence and clinical applications[J]. Clin Transl Oncol, 2013, 15(5): 335-342.
- [4] To KK. MicroRNA: a prognostic biomarker and a possible druggable target for circumventing multidrug resistance in cancer chemotherapy[J]. J Biomed Sci, 2013, 20: 99.
- [5] Song M. Clinical curative effect of paclitaxel plus carboplatin chemotherapy in the treatment of ovarian cancer[J]. China Practical Medicine, 2016, 11(1): 141-142. [宋敏. 紫杉醇联合卡铂化疗治疗卵巢癌的临床疗效观察[J]. 中国实用医药, 2016, 11(1): 141-142.]
- [6] Xu XL, Wu CP, Jiang JT. The role of miRNA-22 in breast cancer and the mechanism[J]. International Journal of Immunology, 2014, 37 (2): 87. [徐小丽, 吴昌平, 蒋敬庭. miRNA-22 在乳腺癌中的作用与机制[J]. 国际免疫学杂志, 2014, 37(2): 87.]
- [7] Wyman SK, Parkin RK, Mitchell PS, 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.
- [8] Hale BJ, Yang CX, Ross JW. Small RNA regulation of reproductive function[J]. Mol Reprod Dev, 2014, 81(2): 148-159.
- [9] Liang SH, Li J, Al-beit M, et al. Screening and identification of potential miRNA involved in ovarian cancer invasion and metastasis [J]. Chinese Journal of Oncology, 2010, 32(9): 53-57. [梁山辉, 李俊, Maria Al-beit, 等. 卵巢上皮恶性肿瘤侵袭转移相关 miRNA 的筛选与鉴定 [J]. 中华肿瘤杂志, 2010, 32(9): 53-57.]
- [10] Sasayama T, Nishihara M, Kondoh T, et al. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC [J]. Int J Cancer, 2009, 125(6): 1407-1413.
- [11] Wang W, Yang LY, Huang GW, et al. Excess RhoC gene expression and invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of Oncology, 2004, 26: 279-282. [王伟, 杨连粤, 黄耿文, 等. RhoC 基因的过量表达与肝细胞癌的侵袭转移 [J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26: 279-282.]

《肿瘤学杂志》关于提交“作者投稿无学术不端行为承诺书”的申明

本刊已开通网上在线投稿系统(<http://www.chinaoncology.cn>), 作者登录网站后, 请在左上角选择《肿瘤学杂志》, 选中后进入首页, 首次投稿作者请先注册, 在完成稿件上传、作者信息填写等程序后, 请您在网站首页(<http://www.chinaoncology.cn>)“下载中心”栏中下载《肿瘤学杂志》的“作者投稿无学术不端行为承诺书文档”, 填写后 1 周内连同单位介绍信、基金证明复印件快递寄至本刊编辑部, 本刊确认收到上述材料后, 该文稿才能进入审稿编辑流程。