

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20180433

MicroRNA-29b 表达改变对卵巢癌细胞增殖及侵袭的影响

季晓微, 王琳, 徐军, 刘素英, 董曦*

复旦大学附属中山医院生殖医学中心, 上海 200032

[摘要] **目的:**探讨 microRNA-29b (miRNA-29b) 在卵巢癌细胞中的表达差异及其对卵巢癌细胞增殖和侵袭能力的影响。**方法:**采用 real-time PCR 技术检测人卵巢癌上皮细胞系 SKOV-3 及正常人卵巢上皮细胞系 IOSE80 中 miRNA-29b 的表达水平;采用转染技术上调 SKOV-3 细胞中 miRNA-29b 的表达水平;采用 CCK-8 法检测 SKOV-3 细胞增殖能力;采用 Transwell 法检测 SKOV-3 细胞的侵袭能力;采用 Western 印迹法检测 SKOV-3 细胞中蛋白表达水平。**结果:**与 IOSE80 细胞相比,人卵巢癌上皮细胞系 SKOV-3 细胞 miRNA-29b 的表达下降 ($P<0.05$)。转染 miRNA-29b mimic 后 SKOV-3 细胞中 miRNA-29b 的表达水平增加;从第 4 天开始,转染 miRNA-29b 的 SKOV3 细胞增殖能力下降 ($P<0.05$)。转染 miRNA-29b 减少了通过聚碳酸酯膜的 SKOV3 细胞数量,抑制了 SKOV3 细胞的侵袭能力 ($P<0.05$);转染 miRNA-29b mimic 后,卵巢癌细胞 SKOV3 中抑制凋亡蛋白 Bcl-2 和侵袭相关蛋白 MMP-9 的表达均降低,与阴性对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论:**miRNA-29b 可通过抑制凋亡相关蛋白 Bcl-2 和侵袭相关蛋白 MMP-9 的表达来抑制卵巢癌细胞的增殖和侵袭。

[关键词] miRNA-29b; 卵巢癌; 细胞增殖; 细胞侵袭; 调控机制

[中图分类号] R 737.33 **[文献标志码]** A

The role of microRNA-29b in ovarian cancer cell proliferation and invasion and its mechanism

JI Xiao-wei, WANG Lin, XU Jun, LIU Su-ying, DONG Xi*

Reproduction Medicine Center, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of miRNA-29b in ovarian cancer cells and its effects on proliferation and invasion of ovarian cancer cells and the underlying mechanisms. **Methods:** Real-time RT-PCR was used to detect the expression level of miRNA-29b in human ovarian cancer epithelial cell line SKOV-3 and human normal ovarian epithelial cell line IOSE80. The expression of miRNA-29b in SKOV-3 cells was up-regulated by transfection technique. CCK-8 assay was used to detect the proliferation of SKOV-3 cells. Transwell migration assay was used to detect the invasion of SKOV-3 cells. Western blotting was used to detect the level of protein expression in SKOV-3 cells. **Results:** The expression of miRNA-29b in human ovarian epithelial cell line SKOV-3 cells decreased significantly (compared with IOSE80 cells, $P<0.05$). The expression level of miRNA-29b in SKOV-3 cells was increased significantly after miRNA-29b mimic transfection ($P<0.05$). From the 4th day, the proliferation of miRNA-29b-transfected SKOV3 cell was significantly increased ($P<0.05$). At the same time, transfection of miRNA-29b significantly reduced the number of SKOV3 cells through the polycarbonate membrane and inhibited the invasiveness of SKOV3 cells ($P<0.05$). After transfection of miRNA-29b mimic, the expression of Bcl-2 and the invasion-related protein MMP-9 in the ovarian cancer cell line SKOV3 were significantly lower than those in the negative control group ($P<0.05$). **Conclusions:** miRNA-29b can inhibit the proliferation and invasion of ovarian cancer cells, probably *via* inhibiting the expression of apoptosis related protein Bcl-2 and invasion related protein MMP-9.

[Key Words] miRNA-29b; ovarian cancer; cell proliferation; cell invasion; regulation mechanism

卵巢癌已成为目前威胁女性健康的常见恶性肿瘤之一。卵巢癌早期发病隐匿,缺乏特异性高的诊断技术,超过 70% 的患者在确诊时已处于晚期;并且其侵袭速度快、复发率高,患者的 5 年生存率低于 30%^[1]。因此,探索特异性强、灵敏度高的诊疗靶点成为目前亟待解决的热点问题。

MicroRNA(miRNA)是一类具有调控靶基因转录水平的内源性小分子非编码 RNA,能通过与靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区特异性结合,抑制 mRNA 的转录水平,实现对功能基因表达的调控,从而参与多种肿瘤细胞增殖和侵袭等恶性生物学行为的调控^[2]。研究证实,miRNA-29b 是一种能够

[收稿日期] 2018-04-25 **[接受日期]** 2018-06-10

[作者简介] 季晓微,硕士,住院医师。E-mail: jxw0905@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-64041990; E-mail: dong.xi@zs-hospital.sh.cn

发挥抑癌作用的 microRNA 分子。目前已经在多种恶性肿瘤中发现 miRNA-29b 的表达异常下降,包括肺癌、乳腺癌、胰腺癌、黑素瘤等多种肿瘤^[3-4]。因此,本研究拟观察 miRNA-29b 对人卵巢癌细胞增殖的调控作用及其分子机制,旨在为卵巢癌的早期诊断和靶向治疗提供潜在的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 人卵巢癌细胞系 SKOV-3 及人正常卵巢上皮细胞系 IOSE80 购自美国 ATCC 细胞库;细胞培养试剂(DMEM 培养基、胎牛血清、链霉素青霉素、胰蛋白酶)购自美国 Gibco 公司;细胞增殖活性检测试剂盒 Cell Counting Kit-8 购自日本同仁化学研究所;ECL 化学发光试剂和 BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;miRNA 提取试剂盒、miRNA 反转录和荧光定量试剂盒、Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司;miRNA-29b mimic、mimic control miRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成,miRNA-29b 和 U6 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,其他常用生化试剂购自美国 Sigma 公司。

1.2 细胞培养 人卵巢癌细胞系 SKOV-3 及人正常卵巢上皮细胞系 IOSE80 复苏后,使用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基进行培养,恒温细胞培养箱条件为 37℃、5% CO₂,每天更换 1 次培养基,细胞融合度 >80% 进行消化、传代和接种,用于后续研究。

1.3 miRNA-29b 表达水平的检测 采用 real-time PCR 检测 SKOV-3 细胞和 IOSE80 细胞中 miRNA-29b 表达水平。收集对数生长期 SKOV-3 细胞和 IOSE80 细胞,使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,使用反转录试剂进行反转录得到总 cDNA,使用荧光定量试剂进行定量,miRNA-29b 表达检测使用 U6 作为内参。miRNA-29b 相对表达按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算。

1.4 细胞转染 处于对数生长期的 SKOV-3 细胞消化收集,按照 10^6 /孔的密度接种于六孔板中,经过 24 h 培养后,使用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂按照试剂盒操作方案将 miRNA-29b mimic 和 mimic control miRNA 分别转染到 SKOV-3 细胞中。将细胞分为空白组(Blank)、阴性对照组(Negative control)及 miRNA-29b 转染组(miRNA-29b)。

1.5 细胞增殖能力检测 采用 CCK-8 试剂检测

SKOV-3 细胞增殖能力,收集对数生长期的细胞,按照 10^4 /孔的密度接种于 96 孔板,细胞分组同上述 3 组,实验操作按照 CCK-8 试剂盒进行,采用全自动酶标仪检测光密度(D_{490})值,计算各组细胞增殖能力。

1.6 细胞侵袭能力检测 采用 Transwell 法检测 miRNA-29b 转染对 SKOV-3 细胞侵袭能力的影响。使用浓度为 1 mg/mL 的 Matrigel 胶体提前将 Transwell 培养板的上室进行包被,下室加入 DMEM 培养基,正常培养 24 h 后取出,放置于显微镜下随机选取视野进行计数。

1.7 细胞蛋白表达水平检测 采用 Western 印迹法检测细胞中蛋白的表达水平。细胞分组同上,使用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞得到总蛋白,使用 BCA 法进行蛋白浓度定量,使用 SDS-PAGE 进行蛋白电泳,使用 PVDF 膜进行电转,经 4℃ 封闭过夜,次日使用相应二抗孵育后通过 ECL 试剂进行化学发光,定量检测目标蛋白表达水平。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,多组间比较采用单因素方差分析,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 miRNA-29b 在不同细胞中的表达差异 结果(图 1)显示:人卵巢癌细胞系 SKOV-3 细胞中 miRNA-29b 的表达显著下降,与人正常卵巢上皮细胞系 IOSE80 细胞差异有统计学意义($P < 0.01$)。

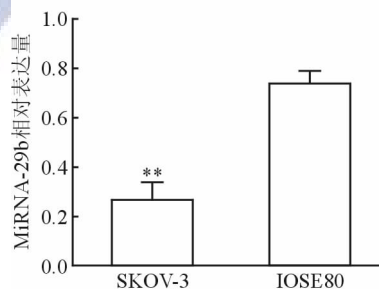


图 1 不同细胞中 miRNA-29b 的相对表达水平

** $P < 0.01$ 与 IOSE80 细胞相比; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 miRNA-29b mimic 转染对 SKOV3 细胞增殖能力的影响 结果(图 2)表明:SKOV3 细胞转染 miRNA-29b mimic 后,细胞中 miRNA-29b 的表达上调,与阴性对照组差异有统计学意义($P < 0.01$)。CCK-8 法检测结果(图 3)显示:转染 miRNA-29b 组 SKOV3 细胞从第 4 天开始增殖能力下降,明显低于阴性对照组细胞($P < 0.05$)。而空白组及阴性对照组差异无统计学意义,证实 miRNA-29b 表达能够抑制 SKOV3 细胞增殖。

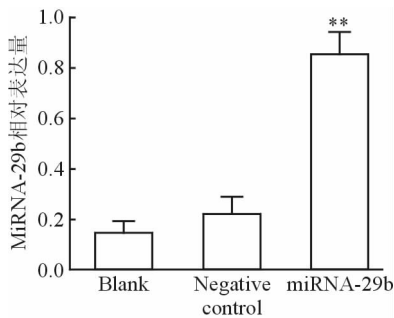


图2 各组细胞中miRNA-29b的表达水平
** $P<0.01$ 与阴性对照组相比; $n=3, \bar{x}\pm s$

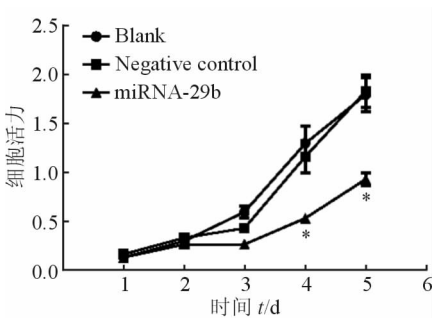


图3 各组细胞增殖能力的对比
* $P<0.05$ 与阴性对照组相比; $n=3, \bar{x}\pm s$

2.3 miRNA-29b 转染对 SKOV3 细胞侵袭能力的影响 结果(图 4)显示:转染 miRNA-29b 显著减少了通过聚碳酸酯膜的 SKOV3 细胞数量,抑制了 SKOV3 细胞的侵袭能力,与阴性对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$),而空白组及阴性对照组相比差异无统计学意义。

2.4 miRNA-29b 转染对凋亡相关蛋白 Bcl-2 和侵袭相关蛋白 MMP-9 表达的影响 结果(图 5)显示:转染 miRNA-29b mimic 后,卵巢癌细胞 SKOV3 中抑制凋亡蛋白 Bcl-2 和侵袭相关蛋白 MMP-9 的表达均下调,与阴性对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$);空白组及阴性对照组差异均无统计学意义。

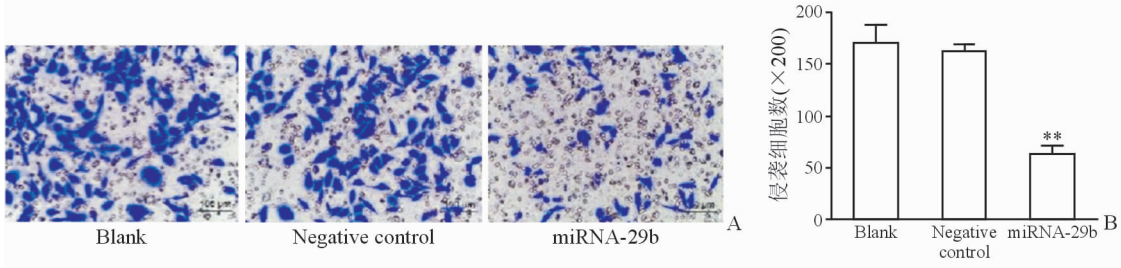


图4 各组细胞侵袭能力的对比
A: 镜下所见(Original magnification: $\times 100$); B: 组间定量对比。 ** $P<0.01$ 与阴性对照组相比; $n=3, \bar{x}\pm s$

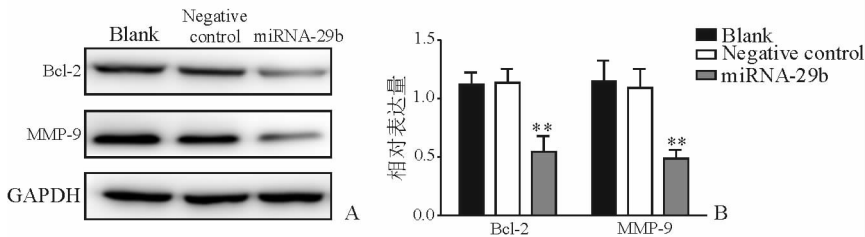


图5 各组细胞中 Bcl-2 和 MMP-9 蛋白表达水平的对比
** $P<0.01$ 与阴性对照组相比; $n=3, \bar{x}\pm s$

3 讨论

恶性肿瘤的发生涉及人体多种原癌基因和抑癌基因的表达失衡。与其他恶性肿瘤一样,卵巢癌的发生发展是多因素影响下的多基因、多步骤的恶性增殖的动态过程,其中 miRNA 所调控的基因表达机制在卵巢癌的发生发展中发挥了重要作用。miRNA-29 是在 2003 年由 Dostie 等^[5]在人神经元中发现,其编码序列位于人体染色体的 1q32. 2: 207801852-207801939 位点。miRNA-29 家族成员主要包括 miRNA-29a、miRNA-29b 和 miRNA-29c,

其中 miRNA-29b 主要定位于细胞核中,能够与多种目标靶基因的 mRNA 发生特异性结合,从而在调控目标基因的表达水平^[5]。Wang 等^[6]研究证实,人乳腺癌组织中 miRNA-29b 的表达异常增加;以人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 为模型,发现抑制 miRNA-29b 的表达后能够促进抑癌蛋白 PTEN 的表达,从而抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭能力。而在人前列腺癌细胞 PC3 和 LNCaP 中,miRNA-29b 的表达下降;通过慢病毒转染增强前列腺癌细胞中 miRNA-29b 的表达水平,能够显著抑制前列腺癌细胞的侵袭能力,其作用可能与 E-cadherin 相关信号

通路有关^[7]。在原发性肝癌中,血清 miRNA-29b 的表达下降程度与患者的疾病进展和预后显著相关,证实 miRNA-29b 在原发性肝癌中发挥抑癌作用^[8]。本研究中,人卵巢癌上皮细胞系 SKOV-3 细胞中 miRNA-29b 的表达下降;与 IOSE80 细胞相比,转染 miRNA-29b mimic 后,SKOV-3 细胞中 miRNA-29b 的表达水平增加,SKOV3 细胞增殖能力从第 4 天开始下降,同时 SKOV3 细胞的侵袭能力下降,初步证实了 miRNA-29b 在卵巢癌中发挥了抑癌基因的作用。

B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)是重要的细胞凋亡蛋白之一。研究认为,Bcl-2 能够显著抑制由多种细胞毒因素(如化疗)所引起的凋亡机制,同时能够增强肿瘤细胞对 DNA 损伤因子的抗性,可作为原发性上皮性卵巢癌的耐药性和预后判断的预测因子^[9]。本研究发现,转染 miRNA-29b mimic 后,卵巢癌细胞 SKOV3 中抑制凋亡蛋白 Bcl-2 的表达降低,与阴性对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloprotein-9, MMP-9)能够降解细胞外基质的锌离子依赖型内肽酶,与多种恶性肿瘤的侵袭性密切相关^[10]。已有研究发现,MMP-9 在卵巢癌组织中高表达,且其表达水平与卵巢癌患者的生存期负相关^[11]。而 Zou 等^[12]的研究显示,MMP-9 调控卵巢癌细胞的侵袭能力是与 IL-6 的介导作用密切相关。转染 miRNA-29b mimic 后,卵巢癌细胞 SKOV3 中侵袭相关蛋白 MMP-9 的表达降低,与阴性对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

综上所述,本研究发现,miRNA-29b 能够抑制卵巢癌细胞的增殖和侵袭能力,具有作为卵巢癌早期诊断和靶向治疗的分子靶点的潜在价值,其作用可能通过抑制凋亡相关蛋白 Bcl-2 和侵袭相关蛋白 MMP-9 的表达来实现。

参考文献

- [1] 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.
- [2] KABOLI P J, RAHMAT A, ISMAIL P, et al. MicroRNA-

based therapy and breast cancer: A comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment[J]. Pharmacol Res, 2015,97:104-121.

- [3] LI Y, CAI B, SHEN L, et al. MiRNA-29b suppresses tumor growth through simultaneously inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by targeting Akt3[J]. Cancer Lett, 2017,397: 111-119.
- [4] PEREPELYUK M, SACKO K, THANGAVEL K, et al. Evaluation of MUC1-aptamer functionalized hybrid nanoparticles for targeted delivery of miRNA-29b to nonsmall cell lung cancer[J]. Mol Pharm, 2018,15(3):985-993.
- [5] DOSTIE J, MOURELATOS Z, YANG M, et al. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs [J]. RNA, 2003,9(2):180-186.
- [6] WANG C, BIAN Z, WEI D, et al. miR-29b regulates migration of human breast cancer cells [J]. Mol Cell Biochem, 2011,352(1-2):197-207.
- [7] RU P, STEELE R, NEWHALL P, et al. miRNA-29b suppresses prostate cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition signaling [J]. Mol Cancer Ther, 2012,11(5):1166-1173.
- [8] ZHENG J J, YU F J, DONG P H, et al. Expression of miRNA-29b and its clinical significances in primary hepatic carcinoma[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2013, 93(12): 888-891.
- [9] MANO Y, KIKUCHI Y, YAMAMOTO K, et al. Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer[J]. Eur J Cancer, 1999, 35(8): 1214-1219.
- [10] MERDAD A, KARIM S, SCHULTEN H J, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis[J]. Anticancer Res, 2014,34(3):1355-1366.
- [11] LENGYEL E, SCHMALFELDT B, KONIK E, et al. Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2001,82(2):291-298.
- [12] 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.

[本文编辑] 廖晓瑜, 姬静芳