

下调 microRNA-214 表达对人卵巢癌 SKOV-3 细胞迁移及侵袭的影响

薛红芳, 吴维光, 赵容(武警后勤学院附属医院 妇产科, 天津 300162)

[摘要] **目的:** 探讨下调 microRNA-214(miR-214)表达对人卵巢癌 SKOV-3 细胞迁移和侵袭的作用及其可能机制。**方法:** 采用脂质体介导法将 miR-214 抑制剂转染人卵巢癌 SKOV-3 细胞, Real-time PCR 法检测 miR-214、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)和尿激酶型纤溶酶原激活剂(uridylyl phosphate adenosine, uPA)基因 mRNA 的表达, Western blotting 法检测细胞 NF- κ B 和 uPA 蛋白表达。划痕试验检测细胞迁移能力, Transwell 小室法检测细胞侵袭能力。**结果:** 经转染 miR-214 抑制剂后, 人卵巢癌 SKOV-3 细胞 miR-214 表达降低, 细胞迁移和侵袭能力降低。同时 NF- κ B 和 uPA mRNA 和蛋白表达也降低。**结论:** 下调人卵巢癌 SKOV-3 细胞 miR-214 表达可抑制细胞迁移和侵袭能力, 下调 NF- κ B 和 uPA 基因表达可能是其作用机制。

[关键词] 卵巢癌; 微小 RNA-214; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R737.31; R730.54

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)04-0506-04

Effect of down-regulating microRNA-214 expression on migration and invasion of ovarian carcinoma SKOV-3 cells

XUE Hongfang, WU Weiguang, ZHAO Rong (Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital Affiliated to Logistics College of the Armed Police Force, Tianjin 300162, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effect of down-regulating microRNA-214(miR-214) expression on migration and invasion of ovarian carcinoma SKOV-3 cells and explore its possible mechanism. **Methods:** miR-214 inhibitors were transfected into human ovarian carcinoma SKOV-3 cells by liposome. Expressions of miR-214, nuclear factor- κ B(NF- κ B) and urokinase-type plasminogen activator(uridylyl phosphate adenosine [uPA]) gene mRNA, as well as NF- κ B and uPA proteins in the cells were respectively detected by Real-time PCR and Western blotting assays. Scarification test and transwell assay were used to detect abilities of migration and invasion of the cells respectively. **Results:** After transfection of miR-214 inhibitor, expression of miR-214 in human carcinoma SKOV-3 cells decreased, and migration and invasion abilities of the cells reduced. At the same time, expressions of NF- κ B and uPA gene mRNA and proteins also depressed. **Conclusion:** Down-regulation of miR-214 expression in human ovarian carcinoma SKOV-3 cells could inhibit migration and invasion abilities of the cells, and down-regulation of NF- κ B and uPA gene expressions might be its possible mechanism.

[Key words] ovarian cancer; microRNA-214; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(4): 506-509. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.008]

卵巢癌是妇科常见恶性肿瘤之一,由于起病隐匿,发展快,死亡率居妇科恶性肿瘤首位。微小 RNA(microRNAs, miRNAs)为一种单链非编码 RNA,作为调控因子参与细胞的生长、增殖、分化和凋亡等多个生命过程。miRNAs 失调与肿瘤发生发展关系密切,研究表明 microRNA-214(miR-214)可通过多种途径影响肿瘤的发生发展,miR-214 在卵巢上皮恶性肿瘤中高表达^[1],但其在卵巢上皮恶性肿瘤发生发展中的作用目前尚不明确。本研究通过下调 miR-214 表达,观察其对卵巢上皮恶性肿瘤细胞迁移和侵袭的影响,以及对侵袭相关的核因子- κ B

(nuclear factor- κ B, NF- κ B)和尿激酶型纤溶酶原激活剂(uridylyl phosphate adenosine, uPA)基因表达的影响,探讨 miR-214 对卵巢上皮恶性肿瘤侵袭转移

[基金项目] 武警后勤学院创新团队课题资助(No. whtd2013-2)。Project supported by Foundation of Innovative Research Team in the Logistics College of Armed Police Force (No. whtd2013-2)

[作者简介] 薛红芳(1984-),女,河北省廊坊市人,住院医师,主要从事卵巢癌综合治疗相关研究, E-mail: xhf_cn@163.com

[通信作者] 吴维光(WU Weiguang, corresponding author), E-mail: weiguangwu02@163.com

的调控作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及试剂

人卵巢上皮癌 SKOV-3 细胞购于武汉典型生物保藏中心,本科实验室储存;RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司, TRIzol 和 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司, SYBR Green Real-time PCR Master Mix 购自 TaKaRa 公司,鼠抗人 NF-κB、uPA 和 β-actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,山羊抗鼠 IgG 购自武汉艾美捷科技有限公司,Transwell 小室购自 Corning 公司,Matrigel 基质胶购于 BD 公司,miR-214 抑制剂及其阴性对照购自美国 Ambion 公司。

1.2 细胞培养及转染

SKOV-3 细胞在含胎牛血清(100 mg/L)的 RPMI 1640 培养液中,37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。取对数生长期细胞,接种于 6 孔板(1 × 10⁶ 个/孔)中培养,当细胞融合达 50% 左右时进行转染。实验组每孔加入 100 μl miR-214 抑制剂(100 pmol/L)或阴性对照组(negative control, NC)及 5 μl Lipofectamin™ 2000,置于上述条件培养。6 h 后更换含胎牛血清(100 mg/L)的 RPMI1640 培养液继续培养,48 h 后收集细胞。实验分为 3 组:正常对照组(未干预的细胞)、阴性对照组(转染 NC 的细胞)、miR-214 抑制组(转染 miR-214 抑制剂的细胞)。

1.3 Real-time PCR 检测转染 miR-214 抑制剂对 miR-214 和 NF-κB、uPA mRNA 表达的影响

TRIzol 一步法分别抽提 3 组细胞总 RNA,以 Randam Primer 为引物,42 °C 60 min,70 °C 5min 进行 cDNA 合成,产物 -20 °C 保存。以 GAPDH 为内参照,各基因引物序列见表 1。PCR 反应条件:95 °C 10 min,95 °C 5 s,60 °C 30 s,72 °C 荧光检测 5 s,共 40 个循环。以 2^{-ΔΔCt} 计算目的基因相对表达量,实验重复 3 次。

1.4 Western blotting 检测下调 miR-214 表达对 SKOV-3 细胞内 NF-κB、uPA 表达影响

分别向 3 组细胞中加入蛋白裂解液,冰上裂解,弃沉淀。BCA 试剂盒蛋白定量。取 20 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE,转移至 PVDF 膜上,脱脂奶(50 g/L)封闭,加鼠抗人 NF-κB、uPA 单抗(1:300),4 °C 孵育过夜,洗膜后与辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠抗体(1:2 000)室温下孵育 1 h,洗膜 3 次,ECL 发光压片成像,以 β-actin 为内参照,用 Quantity One 软件转化为灰度值,蛋白相对表达量 = 目的条带灰度值/β-actin 条带灰度值。实验重复 3 次。

表 1 Real-time PCR 基因引物

Tab. 1 Primers of Real-time PCR

Gene		Primer
miR-214	Upstream	5'-GGACAGCAGGCCGACAGACA-3'
	Downstream	5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'
NF-κB(p65)	Upstream	5'-GGAAAGGAACTCTGTCTCAGAT-3'
	Downstream	5'-TAGGCTGAGGGTACTCAATCA-3'
uPA	Upstream	5'-GCCAACGACAATAGCTTTAC-3'
	Downstream	5'-CACAGTCTGGCAGTCATTAG-3'
GAPDH	Upstream	5'-GCACCGCTCAAGGCTGAGAAC-3'
	Downstream	5'-ATGCTGCTGAAGACGCCAGT-3'

1.5 划痕试验检测下调 miR-214 表达对 SKOV-3 细胞迁移能力的影响

各组培养条件同上,当融合度达 95% 时,用小移液器头划痕,PBS 洗 3 次。改用无血清 RPMI1640 培养液继续培养 24 h,镜下观察并记录划痕距离,通过测量多个点划痕宽度,计算平均划痕愈合率。划痕愈合率(%) = [(0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度] × 100%。实验重复 3 次。

1.6 Transwell 小室法检测下调 miR-214 表达对 SKOV-3 细胞侵袭能力的影响

Transwell 小室底部膜上室面包被一层 Matrigel 基质胶,取各组细胞,上室加入 5 × 10⁴ 个细胞,稀释于 200 μl 不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,下室加入 600 μl 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 24 h。取出膜,用棉签拭净基质胶及上室面细胞,甲醛固定,结晶紫染色后,光学显微镜计数穿透到膜背面细胞数,随机选择 3 个不同视野计数,重复 3 次。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-214 抑制剂抑制 SKOV-3 细胞 miR-214 的表达

Real-time PCR 检测结果显示,与正常对照组和阴性对照组相比,miR-214 抑制剂组细胞 miR-214 表达明显降低[(6.52 ± 0.49) vs (11.32 ± 0.47)、(10.18 ± 0.45), $P = 0.002, 0.004$]。

2.2 下调 miR-214 表达抑制 SKOV-3 细胞的划痕愈合率

结果显示,与正常对照组和阴性对照组比较,miR-214 抑制剂组细胞划痕愈合率显著降低 [(37.22 ± 5.64)% vs (60.56 ± 5.31)%、(61.28 ± 5.46)% , $P=0.004$ 、 0.007];两对照组细胞划痕愈合率相比差异无统计学意义($P=0.613$)。

2.3 下调 miR-214 表达抑制 SKOV-3 细胞的侵袭能力

侵袭实验结果(图 1)显示,miR-214 抑制剂组细胞穿膜数比正常对照组和阴性对照组明显降低 [(57.61 ± 9.17) vs (89.47 ± 9.54)、(84.68 ± 8.15)个, $P=0.002$ 、 0.002);两对照组穿膜细胞数无差异($P=0.768$)。

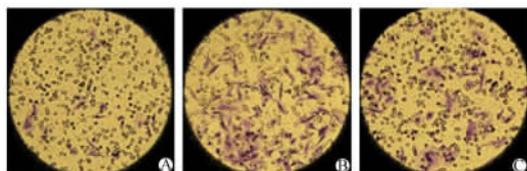


图 1 卵巢癌细胞体外侵袭实验(×400)

Fig.1 Experiment of invasion *in vitro* by oophoroma cells(×400)

A: miR-214 inhibitor; B: Negative control; C: Normal control

2.4 下调 miR-214 表达抑制 SKOV-3 细胞 NF-κB 基因表达

荧光定量 PCR 及 Western blotting 检测结果(图 2)显示,miR-214 抑制剂组 NF-κB mRNA 和蛋白表达均较两对照组显著降低 [(4.10 ± 0.95) vs (7.57 ± 0.98)、(7.36 ± 0.94) , $P=0.013$ 、 0.008]和 [(0.48 ± 0.17) vs (0.85 ± 0.18)、(0.79 ± 0.16) , $P=0.035$ 、 0.037]。

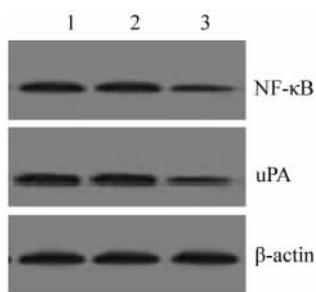


图 2 Western blotting 检测卵巢癌细胞 NF-κB 和 uPA 蛋白表达

Fig. 2 Expressions of NF-κB and uPA proteins in oophoroma cells detected by Western blotting assay

1: Normol control; 2: Negative control; 3: miR-214 inhibitor

2.5 下调 miR-214 表达抑制 SKOV-3 细胞 uPA 基因表达

荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测显示。miR-214 抑制剂组 uPA mRNA 和 uPA 蛋白表达量均比正常对照组和阴性对照组显著降低 [(3.06 ± 0.85) vs (5.54 ± 0.82)、(5.35 ± 0.88) , $P=0.013$ 、 0.009]和 [(0.38 ± 0.29) vs (0.79 ± 0.31)、(0.78 ± 0.35) , $P=0.032$ 、 0.035],两对照组之间表达量差异均无统计学意义。

3 讨论

卵巢癌是女性常见恶性肿瘤之一,易出现腹、盆腔播散和腹膜后淋巴结转移是其主要临床特点,具体机制不明。miRNAs 可调控基因表达,从而抑制靶基因的翻译或促进靶基因 mRNA 的降解^[2]。作为调控基因表达水平的一种重要方式,miRNAs 调节失常与恶性肿瘤的发生发展密切相关,已引起人们的关注。现已发现,多种 miRNAs 表达失常与恶性肿瘤关系密切,其中 miR-214 已成为研究的热点。

miR-214 在多种肿瘤组织中表达异常。在不同的肿瘤中,既可发挥癌基因的作用,又可起抑癌基因作用。miR-214 在肝癌^[3]、骨髓瘤^[4]、宫颈癌^[5]、乳腺癌^[6]和食管癌^[7]等肿瘤细胞中表达降低,具有抑癌基因作用。在骨髓瘤中,miR-214 表达下调,通过调节 p53 起到抑制肿瘤的作用。然而在胰腺癌^[1]和卵巢癌^[8]中表达增高,起癌基因作用。miR-214 在卵巢癌细胞侵袭及转移中的作用及其分子机制有待进一步深入研究。本研究采用脂质体介导方法将 miR-214 抑制剂转染人卵巢癌 SKOV-3 细胞,有效下调 SKOV-3 细胞 miR-214 表达,并发现 miR-214 表达下调后,细胞迁移和侵袭能力下降。说明 miR-214 对卵巢癌细胞的迁移和侵袭功能具有调控作用,下调 miR-214 能够抑制卵巢癌细胞的迁移和侵袭能力。

在肿瘤转移过程中,肿瘤细胞分泌蛋白酶降解细胞外基质及穿过基底膜,突破原发灶的第一道屏障,是肿瘤细胞浸润、转移的主要机制,其中尿激酶型纤溶酶原激活系统是重要因素。尿激酶型纤溶酶原激活系统是介导肿瘤转移的主要酶系,包括 uPA、uPA 特异受体(uPAR)和纤溶酶原激活抑制物 1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)。uPA 是肿瘤细胞分泌的一种丝氨酸蛋白水解酶,可相继激活前基质金属蛋白酶 3 和前基质金属蛋白酶 9,促进胶原纤维降解^[9]。卵巢癌细胞可以分泌尿激酶型纤溶酶原激活剂前体(pro-uPA),其相应受体 uPAR

位于细胞膜上,两者结合后 pro-uPA 可转化为丝氨酸蛋白酶 uPA, uPA 作用于纤溶酶原使其转化为纤溶酶,从而降解肿瘤细胞外基质的多种成分,还可以激活胶原蛋白酶,降解基底膜的主要成分 IV 型胶原^[10]。临床研究^[11]发现, uPA 的表达与卵巢癌的临床分期呈正相关, uPA 表达对评估卵巢癌细胞浸润转移具有重要价值。活化的 NF- κ B 信号通路可促进肿瘤细胞增殖和迁移,调控凋亡相关基因、原癌基因和肿瘤相关黏附分子基因的表达。uPA 是依赖于 NF- κ B 通路调节转录过程的下游基因之一^[12]。本研究发现,下调 SKOV-3 细胞 miR-214 表达后,细胞迁移和侵袭功能降低,同时 SKOV-3 细胞 uPA 和 NF- κ B 基因在 mRNA 和蛋白水平表达均降低。说明下调 miR-214 表达可能通过抑制 uPA 和 NF- κ B 基因表达,降低细胞迁移和侵袭功能。

综上所述,miR-214 对卵巢癌 SKOV-3 细胞的迁移和侵袭功能具有调控作用。下调 miR-214 抑制 uPA 和 NF- κ B 基因表达可能是其作用机制。

[参 考 文 献]

- [1] YANG H, KONG W, HE L, et al. microRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN [J]. *Cancer Res*, 2008, 68 (2): 425-433. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2488.
- [2] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- [3] WANG X, CHEN S, LI F, et al. miR-214 inhibits cell growth in hepatocellular carcinoma through suppression of β -catenin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 428(4): 525-531. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.039.
- [4] MISIEWICZ-KRZEMINSKA I, SARASQUETE M E, QUWAIDER D, et al. Restoration of microRNA-214 expression reduces growth of myeloma cells through positive regulation of p53 and inhibition of DNA replication [J]. *Haematologica*, 2012, 98(4): 640-648. DOI: 10.3324/haematol.2012.070011.
- [5] PENG R Q, WAN H Y, LI H F, et al. MicroRNA-214 suppresses growth and invasiveness of cervical cancer cells by targeting UDR-N-acetyl- α -d-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase 7 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(17): 14301-14309. DOI: 10.1074/jbc.M111.337642.
- [6] DERFOUL A, JUAN A H, DIFILIPPANTONIO A J, et al. Decreased microRNA-214 levels in breast cancer cells coincides with increased cell proliferation, invasion and accumulation of the Polycomb Ezh2 methyltransferase [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32 (11): 1607-1614. DOI: 10.1093/carcin/bgr184.
- [7] HUANG S D, YUAN Y, ZHANG C W, et al. MicroRNA-98 and microRNA-214 post-transcriptionally regulate enhancer of zeste homolog 2 and inhibit migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma [J/OL]. *Mol Cancer*, 2012, 11(1): 51 [2015-11-01]. <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-11-51>. DOI: 10.1186/1476-4598-11-51.
- [8] ZHANG X J, YE H, ZENG C W, et al. Dysregulation of miR-15a and miR-214 in human pancreatic cancer [J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2010, 3 (1): 46 [2015-11-01]. <http://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-8722-3-46>. DOI: 10.1186/1756-8722-3-46.
- [9] 潘其壮, 覃展偶. uPA 系统与肿瘤的研究进展 [J]. *医学综述*, 2010, 16(14): 2140-2143. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2010.14.020.
- [10] AI-HASSAN N N, BEHZADLAU A, CALDWELL P, et al. Differential roles of uPAR in peritoneal ovarian carcinomatosis [J]. *Neoplasia*, 2012, 14(4): 259-270. DOI: 10.1593/neo.12442.
- [11] 许天敏, 崔满华, 林杨, 等. uPA、uPAR 和 PAI-1 在恶性卵巢上皮性肿瘤中的表达及意义 [J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13 (10): 1371-1372. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2009.10.023.
- [12] CARBONE C, MELISI D. NF- κ B as a target for pancreatic cancer therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(Suppl 2): S1-S10. DOI: 10.1517/14728222.2011.645806.

[收稿日期] 2015 - 12 - 03

[修回日期] 2016 - 03 - 30

[本文编辑] 宋关鸿

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司	封二
德国美天旎生物技术有限公司	封三
索尼(中国)有限公司生命科学业务部	封四
上海细胞治疗工程技术研究中心集团	后插页