



## miR-655在上皮性卵巢癌中的表达研究

马方昊, 靳丽杰, 叶国柳, 牡丹丽

引用本文:

马方昊, 靳丽杰, 叶国柳, 等. miR-655在上皮性卵巢癌中的表达研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2020, 45(2): 181-184.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.02.012>

---

## 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

### 低剂量LBH589通过PI3K/AKT途径诱导对上皮性卵巢癌细胞凋亡作用机制研究

Study on the mechanism of apoptosis induced by low-dose LBH 589 through PI3K/AKT pathway in epithelial ovarian cancer cells

蚌埠医学院学报. 2019, 44(6): 708-711 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.06.003>

### 卵巢癌中Metadherin蛋白表达的临床病理意义

The clinical significance of metadherin expression in ovarian cancer

蚌埠医学院学报. 2016, 41(5): 583-585 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.05.008>

### miR-155在结肠癌组织中表达的临床病理意义

Clinical significance of the miR-155 expression in colon cancer tissue

蚌埠医学院学报. 2017, 42(5): 605-608 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.05.013>

### 葡萄糖调节蛋白78在卵巢癌侵袭转移中的作用

Role of glucose-regulated protein 78 in the invasion and metastasis of ovarian cancer

蚌埠医学院学报. 2019, 44(9): 1148-1152,1157 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.09.003>

### microRNA-106b在视网膜母细胞瘤组织中表达的临床意义及其生物学功能研究

Clinical significance and biological function of microRNA-106b expression in retinoblastoma

蚌埠医学院学报. 2017, 42(10): 1333-1336 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.10.012>

# miR-655 在上皮性卵巢癌中的表达研究

马方昊, 靳丽杰, 叶国柳, 牡丹丽

**[摘要]** **目的:**探讨微小 RNA (microRNA, miR)-655 在上皮性卵巢癌中的表达、作用及其可能的分子机制。**方法:**采用实时定量-PCR 检测 miR-655 在 40 对上皮性卵巢癌组织和正常组织中的表达, 分析 miR-655 表达水平与临床病理之间的关系。Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 和流式细胞术检测 miR-655 对卵巢癌细胞增殖及凋亡的影响。Western blotting 检测 PI3K、AKT 和 mTOR 蛋白的表达。**结果:**miR-655 在上皮性卵巢癌组织中的表达量明显低于正常组织 ( $P < 0.01$ )。miR-655 表达水平在不同肿瘤直径、病理分化程度和是否淋巴结转移病人间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ), 而不同年龄、CA-125 病人间 miR-655 mimics 表达差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。转染 miR-655 mimics 可明显抑制卵巢癌细胞的增殖并促进细胞的凋亡 ( $P < 0.01$ ); miR-655 mimics 转染明显抑制卵巢癌细胞中 PI3K、AKT 和 mTOR 活性 ( $P < 0.01$ )。**结论:**miR-655 在卵巢癌组织中明显低表达, miR-655 低表达可能与卵巢癌的肿瘤生长和分化程度相关, miR-655 可明显抑制卵巢癌细胞的增殖, 并促进其凋亡, 其在卵巢癌病人中具有一定的靶向治疗价值。

**[关键词]** 卵巢肿瘤; miR-655; 增殖; 凋亡

**[中图分类号]** R 737.31      **[文献标志码]** A      **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.02.012

## Study on the miR-655 expression in epithelial ovarian cancer

MA Fang-hao, JIN Li-jie, YE Guo-liu, DU Dan-li

(Department of Gynaecological Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression level, function and possible molecular mechanism of microRNA (miR)-655 in epithelial ovarian cancer. **Methods:** The expression levels of miR-655 in 40 cases of epithelial ovarian cancer tissues and normal tissues were detected using real-time quantitative-PCR, and the relationship between miR-655 expression and clinicopathological features was analyzed. The cell counting Kit-8 (CCK-8) and flow cytometry were used to detect the effects of miR-655 on the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells. Western blotting was used to detect the expression of PI3K, AKT and mTOR. **Results:** The expression level of miR-655 in epithelial ovarian carcinoma was significantly lower than that in normal tissues ( $P < 0.01$ ). The differences of the expression levels of miR-655 among patients with different tumor diameter, degree of pathological differentiation and lymph node metastasis were statistically significant ( $P < 0.05$  to  $P < 0.01$ ), and the differences of the expression levels of miR-655 among patients with different ages and CA-125 were not statistically significant ( $P > 0.05$ ). The transfection of miR-655 mimics could significantly inhibit the proliferation and promote apoptosis of ovarian cancer cells ( $P < 0.01$ ). The transfection of miR-655 mimics significantly could significantly inhibit the expression of PI3K, AKT and mTOR in ovarian cancer cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** The low expression of miR-65 in ovarian cancer tissue is significant, which may be related to the growth and differentiation of ovarian cancer. miR-655 can significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis of ovarian cancer cells. miR-655 has a certain value of target therapy in ovarian cancer patients.

**[Key words]** ovarian neoplasms; miR-655; proliferation; apoptosis

卵巢恶性肿瘤发病率在女性生殖器肿瘤中占第三位,但其死亡率是最高的,严重威胁女性健康<sup>[1]</sup>。当病人发生不适就诊时,大多数已进入晚期。虽然近几十年来,已经成功探索出在肿瘤细胞减灭术基础上辅助化疗的治疗策略,但晚期卵巢癌的 5 年生存率仍然很低。因此,发现卵巢癌的早期诊断方法、

探索其发生、发展机制具有重要临床价值。微小 RNA (microRNA, miR) 是一类内生的、长度为 20 ~ 24 个核苷酸的小 RNA<sup>[2]</sup>, 其通过降解靶基因 mRNA 或抑制其翻译, 在转录后水平调控基因的表达进而发挥功能。随着对 miR 研究的深入, 人们发现其在肿瘤的发生、发展中发挥重要的作用, 包括肿瘤细胞的增殖、侵袭与凋亡转移等。有研究<sup>[3]</sup> 表明, miR-506 在宫颈癌中低表达, 可显著抑制宫颈癌细胞的转移能力。而 miR-873 在卵巢癌组织与细胞中的表达明显高于正常组织和细胞, 其通过靶向 ABCB1 介导卵巢癌的耐药<sup>[4]</sup>。miR 作为肿瘤治疗的靶点越来越

[收稿日期] 2017-10-31 [修回日期] 2018-12-17

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 妇产科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 马方昊(1991-), 女, 硕士研究生。

[通信作者] 牡丹丽, 主任医师. E-mail: dudanli0224@sina.com

越受到人们的重视。近来有报道<sup>[5-6]</sup>发现 miR-655 在多种肿瘤中的表达下调,可能在肿瘤发生过程中发挥着抑癌的作用,但其在卵巢癌发生、发展中的作用及机制尚未见报道。本研究采用 RT-PCR、CCK-8 以及流式细胞术方法检测上皮性卵巢癌组织以及细胞中 miR-655 表达量以及调节 miR-655 对卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响,并通过 Western blotting 研究其相关分子机制。现作报道。

## 1 材料与方法

1.1 标本采集 标本采自 2010 年 1 月至 2015 年 1 月经我院妇科行手术切除治疗的上皮性卵巢癌病人 40 例,另选取正常卵巢组织 40 例(来自子宫肌瘤或卵巢良性肿瘤需切除全子宫及卵巢的病人),术后均经我院病理科确诊。入组病人术前均未接受过放疗、化疗或激素治疗。组织标本离体后切取并迅速置于液氮罐内  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。本研究获得我院伦理委员会批准并征得病人及家属的知情同意。

1.2 实时定量 PCR 应用 miR 特异性 TaqMan 探针和 TaqMan Universal PCR Master Mix 进行 miR-655 的实时定量 PCR 检测。反应在 ABI StepOne Plus Detection system 进行,扩增条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,扩增 40 个循环。选择 U6 作为内参,  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (CT 示循环阈值,  $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{miR-655}} - \text{CT}_{\text{U6}}$ ) 计算 miR-655 相对表达量。肿瘤组织中 miR-655 表达高于对应癌旁组织为高表达组,反之则为低表达组。

1.3 细胞培养 人卵巢癌细胞 SKOV3 和 A2780 及正常上皮细胞 IOSE80 购于上海中国科学院细胞库,所有细胞均采用 DMEM 培养基加 10% 胎牛血清及 1% 青、链霉素培养,培养环境为 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  湿化培养箱。

1.4 细胞转染 转染前 24 h 将细胞以 40% ~ 50% 密度铺于 6 孔板中,运用 miR-655 mimics (GenePharma 公司)、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司)转染试剂上调 miR-655。转染 6 h 后更换新鲜培养基继续孵育。24 ~ 48 h 后收集细胞检测转染效率并进行功能试验。

1.5 细胞增殖实验 采用 CCK-8 方法检测细胞增殖能力。细胞转染后 24 h,将细胞按每孔 3 000 个接种于 96 孔板,分别于 24、48、72、96 h 进行检测,在酶标仪上以波长 450 nm 测各孔的吸光度值,以上实验重复 3 次。

1.6 细胞凋亡实验 转染后 48 h 收集 6 孔板中细

胞,冰 PBS 洗涤两遍后加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 和 10  $\mu\text{L}$  碘化丙啶 (PI) 室温避光 15 min,用流式细胞仪分析,以上实验重复 3 次。

1.7 Western blotting 用 RIPA 裂解细胞,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白含量,加入蛋白上样缓冲液后 100  $^{\circ}\text{C}$  煮 10 min。SDS-PAGE 进行电泳分离后,采用湿转膜法转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,加入二抗孵育 2 h, PBST 洗 3 次,每次 15 min,加入发光反应液,凝胶电泳成像系统进行读片分析,实验重复 3 次。

1.8 统计学方法 采用 *t* 检验、方差分析和  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 miR-655 在卵巢癌组织及细胞中的表达量明显降低 首先检测了 miR-655 在 40 对卵巢癌及正常组织中的表达情况,结果显示癌组织中 miR-655 表达量 ( $0.16 \pm 0.03$ ) 明显低于正常组织 ( $0.33 \pm 0.04$ ) ( $t = 21.50, P < 0.01$ )。进一步检测 miR-655 在细胞中的表达情况,结果显示,卵巢癌细胞 SKOV3 和 A2780 中 miR-655 表达均明显低于正常细胞 IOSE80 ( $P < 0.01$ ) (见表 1)。

表 1 卵巢癌细胞与正常细胞中 miR-655 的表达比较 ( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

分组	MiR-655 相对表达量	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> <sub>组内</sub>
IOSE80	$0.42 \pm 0.05$			
SKOV3	$0.10 \pm 0.05^{**}$	8.95	<0.01	0.001
A2780	$0.06 \pm 0.01^{**}$			

*q* 检验:与 IOSE80 比较 \* \*  $P < 0.01$

2.2 不同病理特征卵巢癌病人的 miR-655 表达水平存在差异 以卵巢癌病人 miR-655 相对表达量中位数为参照,将 miR-655 表达分为高表达组 18 例和低表达组 22 例,进一步分析 miR-655 相对表达量与卵巢癌病人临床资料之间的关系,结果显示,miR-655 表达水平在不同肿瘤大小、病理分化程度和是否淋巴结转移病人间差异均有统计学意义 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ),而不同年龄、CA-125 病人间 miR-655 表达差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (见表 2)。

2.3 转染 miR-655 mimics 显著升高 miR-655 在 SKOV3 和 A2780 细胞中表达 为探讨 miR-655 在卵巢癌细胞中的作用,首先对 A2780 和 SKOV3 两株细胞进行 miR-655 过表达,通过 RT-PCR 验证 miR-

655 的转染效率,结果显示,SKOV3 和 A2780 细胞中 miR-655 表达量在转染后均明显高于转染前( $P < 0.01$ )(见表 3)。

表 2 miR-655 相对表达与卵巢癌病人临床病理特征的关系 [ $n$ ;百分率(%)]

特征	miR-655 高表达 ( $n = 18$ )	miR-655 低表达 ( $n = 22$ )	$\chi^2$	$P$
年龄/岁				
<55	9(50.00)	8(36.36)	0.75	>0.05
≥55	9(50.00)	14(63.64)		
肿瘤直径/cm				
<3	12(66.67)	6(27.27)	6.21	<0.05
≥3	6(33.33)	16(72.73)		
CA-125/(U/mL)				
<500	11(61.11)	9(40.91)	1.62	>0.05
≥500	7(38.89)	13(59.09)		
淋巴结转移				
有	10(55.56)	5(22.73)	4.55	<0.05
无	8(44.44)	17(77.27)		
病理分化程度				
高、中	14(77.78)	7(31.82)	8.39	<0.01
低	4(22.22)	15(68.18)		

表 3 miR-655 过表达后细胞内的 miR-655 相对表达水平 ( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

细胞系	转染前	转染后	$t$	$P$
SKOV3	0.064 ± 0.013	1.413 ± 0.013	127.09	<0.01
A2780	0.159 ± 0.088	1.432 ± 0.062	20.48	<0.01

2.4 上调 miR-655 可抑制卵巢癌细胞增殖 转染 miR-655 mimics 后 24、48、72 h, 卵巢癌细胞 A2780 和 SKOV3 细胞增殖均明显低于未转染组, miR-655 上调明显抑制 SKOV3 和 A2780 细胞生长 ( $P < 0.01$ )(见表 4)。

2.5 上调 mi-655 可促进卵巢癌细胞的凋亡 转染 miR-655 mimics 后, 卵巢癌细胞 SKOV3 和 A2780 的细胞凋亡明显高于未转染组, miR-655 上调明显促进 SKOV3 和 A2780 细胞凋亡 ( $P < 0.01$ )(见表 5)。

2.6 miR-655 在卵巢癌中作用的相关机制 为进一步探讨, miR-655 调节卵巢癌细胞生长, 凋亡的分子机制, 采用 Western blotting 检测 A2780 和 SKOV3 细胞在转染 miR-655 mimics 之后 PI3K/AKT/mTOR 信号通路活性的变化, 结果表明, miR-655 过表达可明显降低 PI3K、AKT 和 mTOR 的磷酸化水平 ( $P < 0.01$ )(见表 6)。

表 4 转染与未转染 miR-655 mimics 卵巢癌细胞增殖比较 ( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

分组	0 h	24 h	48 h	72 h	$F$	$P$	$MS_{组内}$
SKOV3							
未转染	0.48 ± 0.04	0.90 ± 0.04	1.46 ± 0.06	1.90 ± 0.04	6.78	<0.05	0.17
转染	0.50 ± 0.04	0.65 ± 0.03	0.90 ± 0.04	1.25 ± 0.07	8.62	<0.01	0.038
$t$	0.61	8.66	13.45	13.96	—	—	—
$P$	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	—	—	—
A2780							
未转染	0.96 ± 0.05	1.54 ± 0.06	1.96 ± 0.06	2.39 ± 0.07	12.56	<0.01	0.09
转染	0.97 ± 0.05	1.23 ± 0.06	1.45 ± 0.07	1.74 ± 0.07	9.92	<0.01	0.03
$t$	0.24	6.33	9.58	11.37	—	—	—
$P$	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	—	—	—

表 5 miR-655 过表达与对照组凋亡细胞数 ( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

分组	SKOV3	A2780
未转染	3.78 ± 0.51	4.14 ± 0.49
转染	10.53 ± 0.51	13.35 ± 1.21
$t$	16.24	12.24
$P$	<0.01	<0.01

表 6 miR-655 过表达后 PI3K/AKT/mTOR 信号通路活性的变化 ( $n_i = 3$ )

分组	p-PI3K	p-AKT	p-mTOR
SKOV3			
转染前	0.32 ± 0.01	0.38 ± 0.001	0.41 ± 0.01
转染后	0.21 ± 0.01	0.23 ± 0.009	0.23 ± 0.001
$t$	13.47	28.69	31.02
$P$	<0.01	<0.01	<0.01
A2780			
转染前	0.25 ± 0.03	0.39 ± 0.010	0.55 ± 0.030
转染后	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.020	0.12 ± 0.001
$t$	5.48	17.82	24.81
$P$	<0.01	<0.01	<0.01

### 3 讨论

卵巢癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一。早期卵巢癌的治疗可取得较好的疗效, 然而对于进展期的病人由于明显的耐药以及早期复发仍无有效的治疗方法<sup>[7]</sup>。由于卵巢位于盆腔深部, 早期没有明显症状, 多数病人诊断时在中期或晚期, 5 年存活率约 30%<sup>[8]</sup>。而卵巢癌预后差的主要原因是早期诊断难、容易产生耐药和复发<sup>[9]</sup>。因此, 发现卵巢癌的诊断指标、探索其增殖机制具有一定临床价值, 为临



床治疗提供治疗靶点。

miR-655 是近年来新报道的一个小分子 RNA, 已有研究显示 miR-655 在一些肿瘤中低表达, 起到抑制肿瘤的作用。有研究<sup>[5]</sup>表明 miR-655 在乳腺重度不典型增生和乳腺癌病人血浆中的表达明显低于健康人群, 在乳腺癌的早期诊断中具有一定的临床价值。HARAZONO 等<sup>[10]</sup> 研究显示 miR-655 通过靶向调节 ZEB1 和 TGFB2 抑制上皮间质转化的发生抑制肿瘤细胞的发生、发展。本研究通过实时定量-PCR 检测 miR-655 在卵巢癌组织中的表达量显著低于正常组织, 且不同肿瘤直径、淋巴结是否转移及分级病人的 miR-655 表达水平差异有统计学意义, 而不同 CA-125 及年龄病人 miR-655 表达水平差异无统计学意义。为进一步研究其在卵巢癌中的作用, 我们检测了其在卵巢癌细胞株中的表达情况, 结果显示 miR-655 在卵巢癌细胞 SKOV3 和 A2780 的表达较正常卵巢上皮细胞明显降低。转染 miR-655 mimics 至 SKOV3 和 A2780 细胞, 通过 CCK-8 以及流式细胞术检测 miR-655 对卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响, 结果发现过表达 miR-655 可显著抑制细胞的生长并促进凋亡。以上结果表明 miR-655 在卵巢癌中发挥同其他肿瘤一样的抑癌作用。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路在肿瘤的发生发展起重要的作用, 该通路的异常活化可明显促进肿瘤细胞的生长、转移并抑制其凋亡<sup>[11-12]</sup>。例如 Annexin A5 通过活化 AKT/mTOR, 在体内外促进肾癌细胞的增殖、侵袭与转移<sup>[13]</sup>, 而达努塞替可通过抑制 AKT/mTOR 通路诱导卵巢癌细胞的凋亡、阻断细胞周期, 发挥抑癌作用<sup>[14]</sup>。因此, 本实验探讨 miR-655 是否通过该通路发挥作用, 结果表明当 SKOV3 和 A2780 细胞转染 miR-655 mimics 后, PI3K、AKT 和 mTOR 的磷酸化水平明显降低。

综上所述, miR-655 在卵巢癌中的表达量明显降低, 在卵巢癌的生长与凋亡过程中发挥重要作用, 其潜在机制可能是通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路发挥抑制卵巢癌的作用。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] CARDOZO ER, THOMSON AP, KARMON AE, *et al.* Ovarian stimulation and in-vitro fertilization outcomes of cancer patients undergoing fertility preservation compared to age matched controls: a 17-year experience[J]. *Assist Reprod Genet*, 2015, 32(4):587.
- [2] LI Y, YAO L, LIU F, *et al.* Characterization of microRNA expression in serous ovarian carcinoma[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(2):491.
- [3] 朱小晖, 张申华. 宫颈癌组织中 microRNA-506 表达及临床病理意义[J]. *蚌埠医学院学报*, 2016, 41(3):325.
- [4] WU DD, LI XS, MENG XN, *et al.* MicroRNA-873 mediates multidrug resistance in ovarian cancer cells by targeting ABCB1[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(8):10499.
- [5] 嵇守荣. 血浆 miR-655 作为乳腺癌早期诊断标志物的临床价值[J]. *中国医师杂志*, 2016, 18(9):1396.
- [6] WU G, ZHENG K, XIA S, *et al.* MicroRNA-655-3p functions as a tumor suppressor by regulating ADAM10 and  $\beta$ -catenin pathway in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1):1.
- [7] CLARKE-PEARSON DL. Screening for ovarian cancer[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(2):170.
- [8] SEDLÁKOVÁ I, LACO J, CALTOVÁ K, *et al.* Clinical significance of the resistance proteins LRP, Pgp, MRP1, MRP3, and MRP5 in epithelial ovarian cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2015, 25(2):236.
- [9] CONDE J, ARTZI N. Are RNAi and miRNA therapeutics truly dead? [J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(3):141.
- [10] HARAZONO Y, MURAMATSU T, ENDO H, *et al.* miR-655 Is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFB2 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e62757.
- [11] 牛国栋, 张树友. PI3K/AKT 信号传到通路肿瘤[J]. *现代卫生医学进展*, 2010, 10(20):3394.
- [12] 张超, 杨娜, 章熊文, 等. 靶向 PI3K-AKT-mTOR 信号通路抑制剂的研究进展[J]. *中国癌症杂志*, 2006, 16(12):1064.
- [13] TANG J, QIN Z, HAN P, *et al.* High Annexin A5 expression promotes tumor progression and poor prognosis in renal cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(5):1839.
- [14] ZI D, ZHOU ZW, YANG YJ, *et al.* Danusertib induces apoptosis, cell cycle arrest, and autophagy but inhibits epithelial to mesenchymal transition involving PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human ovarian cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11):27228.

( 本文编辑 卢玉清 )