

miR-122-5p 靶向 ADAM10 调控 Notch 信号通路 对人卵巢癌细胞 SKOV-3 的上皮-间质转化的抑制作用

李根林, 刘杰, 谢晶, 余芙蓉, 胡意

摘要 目的 研究 miR-122-5p 对人卵巢癌细胞 SKOV-3 上皮-间质转化(EMT)的影响,阐明其可能机制。方法 常规体外培养人卵巢癌细胞 SKOV-3,将 miR-122-5p 模拟物(miR-122-5p mimic)及其阴性对照(mimic NC)转染至 SKOV-3 细胞,分为空白对照组(Blank 组)、mimic NC 组和 miR-122-5p mimic 组,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测各组细胞 miR-122-5p 和 ADAM10 mRNA 的表达水平;Western blot 检测各组细胞 ADAM10 蛋白的表达水平;生物信息学预测 miR-122-5p 与 ADAM10 靶向匹配,采用双荧光素酶报告系统验证两者在 SKOV-3 细胞中的靶向关系。再将 miR-122-5p mimic 和 ADAM10 过表达质粒(pcDNA-ADAM10)分别或同时转染至 SKOV-3 细胞中,分为空白对照组(Blank 组)、miR-122-5p mimic 组、ADAM10 过表达组(pc-ADAM10 组)和 miR-122-5p mimic + pc-ADAM10 组,采用 Transwell 检测 SKOV-3 细胞的迁移和侵袭能力;Western blot 检测细胞 Notch 信号通路相关蛋白 Notch1、HES1 和 HEY1,EMT 相关蛋白 Snail、E-cadherin 和 N-cadherin 的表达水平。结果 miR-122-5p mimic 组 SKOV-3 细胞中 miR-122-5p 的表达水平较 mimic NC 组的升高($P < 0.01$),表明 miR-122-5p mimic 稳定转染至 SKOV-3 细胞。miR-122-5p mimic 组 SKOV-3 细胞中 ADAM10 mRNA 和蛋白的表达水平较 mimic NC 组的降低($P < 0.01$)。双荧光素酶报告系统证实 ADAM10 是 miR-122-5p 靶基因。与 Blank 组比较,miR-122-5p mimic 组 SKOV-3 细胞发生迁移和侵袭的数量降低($t = 6.004, P < 0.05; t = 7.289, P < 0.01$),而 pc-ADAM10 组的升高($t = 13.181, P < 0.001; t = 11.504, P < 0.01$);miR-122-5p mimic 组细胞的 Notch、HES1、HEY1、Snail 和 N-cadherin 蛋白表达水平下降($P < 0.05, P < 0.01$),而 pc-ADAM10 组的上升($P < 0.01$);miR-122-5p mimic 组细胞的 E-cadherin 蛋白表达水平上升($P < 0.01$),而 pc-ADAM10 组的下降($P < 0.01$)。与 pc-ADAM10 组比较,miR-122-5p mimic + pc-ADAM10 能减弱 pc-ADAM10 的促 EMT 作用,且下调 Notch 信号通路活性。结论 miR-122-5p 通过阻断 Notch 信号通路抑制人卵巢癌细胞

SKOV-3 的 EMT,其机制可能与 miR-122-5p 靶向抑制 ADAM10 的表达有关。

关键词 人卵巢癌细胞 SKOV-3; 上皮-间质转化; Notch 信号通路; 去整合素金属蛋白酶 10

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)01-0054-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.011

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)使肿瘤细胞失去上皮特性,获得间质特性,促进肿瘤细胞侵袭和转移。研究^[1]表明 EMT 与卵巢肿瘤的转移有关。去整合素金属蛋白酶 10(a disintegrin and metalloprotease 10, ADAM10)是细胞膜相关蛋白,能触发配体-受体结合而激活 Notch 信号通路,调节细胞迁移^[2]。但 ADAM10 是否通过 Notch 信号通路参与卵巢癌细胞的迁移尚不清楚。microRNA(miRNA)是一种非编码的小 RNA,调控靶向信使 RNA(mRNA)^[3]。miR-122-5p 在卵巢癌患者外泌体中异常低表达^[4],但 miR-122-5p 对人卵巢癌 EMT 的作用尚未明确。该研究通过共转染 miR-122-5p 过表达和 ADAM10 过表达载体,探讨 miR-122-5p 与 ADAM10 的靶向关系以及 Notch 信号通路在人卵巢癌细胞 EMT 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂和仪器 人卵巢癌细胞 SKOV-3 及 McCoy's 5a 培养基购自美国 ATCC 公司;胎牛血清和完全培养基购自美国 Gibco 公司;胰蛋白酶购自武汉纯度生物科技有限公司;转染试剂 Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司。TRIzol 试剂购自上海晶抗生物工程有限公司;BCA 蛋白质定量检测试剂盒和蛋白裂解液购自上海生工;Matrigel 购自美国 BD 公司;逆转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒购自大连宝生物工程公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国 Promega 公司;ADAM10 野生型(Wt)和突变型(Mut)荧光素酶质粒载体 pcDNA-ADAM10(pc-ADAM10)、miR-122-5p mimic 及其阴性对照 mimicNC 均由上海吉玛制药技术有

2020-07-13 接收

基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(编号:17C1386)

作者单位:南华大学附属第一医院妇科,衡阳 421000

作者简介:李根林,女,硕士研究生;

刘杰,女,本科,副主任医师,责任作者, E-mail: liujuan5918@126.com

限公司合成; 兔抗人 ADAM10 抗体购自美国 Novus Biological 公司; 兔抗人 Notch1 抗体、兔抗人 HES 家族 bHLH 转录因子 1 (hairy and enhancer of split homolog-1, HES1) 抗体、兔抗人 Hairy 相关转录因子 1 (hairy and enhancer of split related with YRPW motif-1, HEY1) 抗体、兔抗人 Snail 抗体、兔抗人 E-cadherin 抗体、兔抗人 N-cadherin 抗体和 GAPDH 购自英国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司。实时荧光定量仪(7500) 购自美国应用生物系统公司; 垂直电泳槽、电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司; 低温离心机购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 用含有 10% 胎牛血清的 McCoy's 5a 培养基在 37 °C 含 5% CO₂ 的恒温培养箱中进行培养, 待人卵巢癌细胞 SKOV-3 生长到对数期后, 用 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸溶液冲洗细胞。再加入 5 ml 完全培养基在 37 °C 含 5% CO₂ 的恒温培养箱中常规培养。将 1×10^5 个/ml SKOV-3 细胞接种在 6 孔板中培养 24 h, 再根据转染试剂盒说明书, 利用 Lipofectamine 3000 将 miR-122-5p mimic 和 pc-ADAM10 分别或同时转染至 SKOV-3 细胞中。将 SKOV-3 细胞分为 5 组: ①空白对照组 (Blank 组): 不进行任何处理的 SKOV-3; ②阴性对照组 (mimic NC 组): 转染了 mimic NC 的 SKOV-3 细胞; ③过表达组 (miR-122-5p mimic 组): 转染了 miR-122-5p mimic 的 SKOV-3 细胞; ④ADAM10 过表达组 (pc-ADAM10 组): 转染了 pc-ADAM10 的 SKOV-3 细胞; ⑤共转染组 (miR-122-5p mimic + pc-ADAM10 组): 同时转染了 miR-122-5p mimic 和 pc-ADAM10 的 SKOV-3 细胞。每组做 3 个复孔。

1.2.2 qRT-PCR 法检测 miR-122-5p 和 ADAM10 的 mRNA 相对表达量 用 TRIzol 法提取转染 miR-122-5p mimic 的 3 组细胞总 RNA, 然后按逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA, 并用荧光定量 PCR 方法以 cDNA 为模板进行定量扩增。所用 PCR 引物序列: miR-122-5p 上游引物为 5'-GGGGTG-GAGTGTGACAATG-3', 下游引物为 5'-CAGTGCCT-GTCGTGGAGT-3'; ADAM10 上游引物为 5'-AA-GAAGCTTCCCACAAGGCA-3', 下游引物为 5'-TGTG-TACGCAGAGTATCTAACTGG-3'; GAPDH 上游引物为 5'-ACTAGGCGCTCACTGTTCTC-3', 下游引物为 5'-ATCCGTTGACTCCGACCTTC-3'; U6 上游引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCCACA-3', 下游引物为 5'-

AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。反应程序: 95 °C 预变性 5 min, 然后 95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 s, 35 个循环后, 72 °C 终延伸 10 min。得到结果 Ct 值, 再采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miR-122-5p 和 ADAM10 的 mRNA 的表达量。将 Blank 组的 mRNA 表达量设为 1, 其他组的与 Blank 组的 mRNA 表达量比值为该组 mRNA 的相对表达量。

1.2.3 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-122-5p 与 ADAM10 的相互作用关系 用 Targetscan (<http://www.targetscan.org>) 之间存在的碱基互补配对关系。将人卵巢癌细胞 SKOV-3 以 1×10^4 个/孔接种在 96 孔板上, 当孔内细胞达到 60% 的密度后, 用试剂 Lipofectamine 3000 将 miR-122-5p mimic、mimic NC 分别与 ADAM10-Wt、ADAM10-Mut 荧光素酶质粒共转染至 SKOV-3 细胞中。转染 48 h 后用双荧光素酶报告系统检测各组荧光素酶活性。相对荧光素酶活性用萤火虫与肾素荧光素酶活性之比表示。

1.2.4 Transwell 法检测细胞的迁移和侵袭情况 取共转染四组对数生长期 SKOV-3 细胞, 将细胞悬液调整为 2×10^5 个/ml 接种到 Transwell 上室, 将含 10% 胎牛血清的培养基加入 Transwell 下室后在 37 °C 培养箱中培养 24 h。再用 0.1% 结晶紫染色 30 min, 最后将 Transwell 小孔倒置在显微镜下, 在 200 倍视野中, 将膜分为上下左右中五部分, 分别计算细胞数量后做平均数, 即为迁移的细胞数量。提前准备 Matrigel, 用预冷的无血清培养基将 Matrigel 稀释成 1 mg/ml 浓度, 再将 100 μ l 的 Matrigel 加入 Transwell 上室底部中央, 然后在 37 °C 培养箱中温育 5 h 成胶状。再取对数生长期 SKOV-3 细胞, 步骤与迁移一致, 最后在 200 倍视野的显微镜下, 采用同样的方法观察侵袭的细胞数量。

1.2.5 Western blot 法检测 ADAM10 蛋白、Notch 通路蛋白和 EMT 蛋白表达水平 用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液裂解共转染的四组 SKOV-3 细胞。12 000 r/min 离心 5 min 后收集上清液, 在水浴中加热使蛋白质变性。用 BCA 法定量蛋白质后, 用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质, 转移到硝酸纤维素膜 (PVDF)。然后, 用脱脂奶粉室温封闭膜 30 min, 再加入一抗 ADAM10、Notch1、HES1、HEY1、Snail、E-cadherin、N-cadherin 在 4 °C 下孵育过夜, 用 Tris-HCl 缓冲盐 + Tween 20 (TBST) 溶液冲洗 PVDF 膜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h。加入化学发光液, 待出现条带后终止反应。GAPDH 用作内参照物, 目的条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的

比值为目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计分析。各组 SKOV-3 细胞 miR-122-5p 的表达水平、ADAM10 mRNA 和蛋白表达水平、发生迁移和侵袭的 SKOV-3 细胞数量、在 SKOV-3 细胞中 Notch1、HES1、HEY1、Snail、N-cadherin 以及 E-cadherin 蛋白表达水平均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD 法分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-122-5p 对人卵巢癌细胞 SKOV-3 中 ADAM10 的表达水平的影响 miR-122-5p mimic 转染到 SKOV-3 细胞后,与 Blank 组和 mimic NC 组比较,miR-122-5p mimic 组细胞中 miR-122-5p 表达水平升高 ($F = 98.17, P < 0.01$, 图 1A),而 ADAM10 mRNA (图 1B) 和蛋白 (图 1C) 表达水平均降低 ($F = 100.6, P < 0.01; F = 50.38, P < 0.01$),这说明 miR-122-5p 与 ADAM10 之间可能存在靶向调控关系。

2.2 miR-122-5p 与 ADAM10 的靶向关系 生物信息学分析表明,miR-122-5p 与 ADAM10 的 3'-UTR 区具有靶向结合位点(图 2A)。在 ADAM10-Wt 的人卵巢癌细胞 SKOV-3 中,与 mimic NC 组比较,miR-122-5p mimic 组相对荧光素酶活性降低 ($t = 11.73, P < 0.01$, 图 2B)。此结果表明在人卵巢癌细胞 SKOV-3 中,miR-122-5p 能与 ADAM10 mRNA 靶向结合。

2.3 过表达 miR-122-5p 对 SKOV-3 细胞迁移能力的影响 与 Blank 组 (135.33 ± 25.34) 相比,miR-122-5p mimic 组 SKOV-3 细胞发生迁移的细胞数目 (37.33 ± 12.54) 降低 ($t = 6.004, P < 0.05$),而 pc-ADAM10 组发生迁移的细胞数目 (458.00 ± 34.05) 升高 ($t = 13.181, P < 0.001$)。与 pc-ADAM10 组相比,miR-122-5p mimic + pc-ADAM10 组发生迁移的细胞数目 (195.67 ± 26.10) 降低 ($t = 10.633, P < 0.01$)。结果表明过表达 miR-122-5p 能抑制 ADAM10 过表达诱导 SKOV-3 细胞迁移的作用。见图 3。

2.4 过表达 miR-122-5p 对 SKOV-3 细胞侵袭能力的影响 与 Blank 组 (157.00 ± 22.60) 相比,miR-122-5p mimic 组 SKOV-3 细胞穿过基底膜发生侵袭的细胞数目 (44.00 ± 14.58) 降低 ($t = 7.289, P < 0.01$),而 pc-ADAM10 组穿过基底膜发生侵袭的细胞数目 (428.67 ± 43.44) 升高 ($t = 11.504, P <$

0.01)。与 pc-ADAM10 组比较,miR-122-5p mimic + pc-ADAM10 组穿过基底膜发生侵袭的细胞数目 (232.67 ± 26.52) 降低 ($t = 8.515, P < 0.01$)。以上结果表明过表达 miR-122-5p 具有抑制高表达 ADAM10 诱导 SKOV-3 细胞侵袭的作用。见图 4。

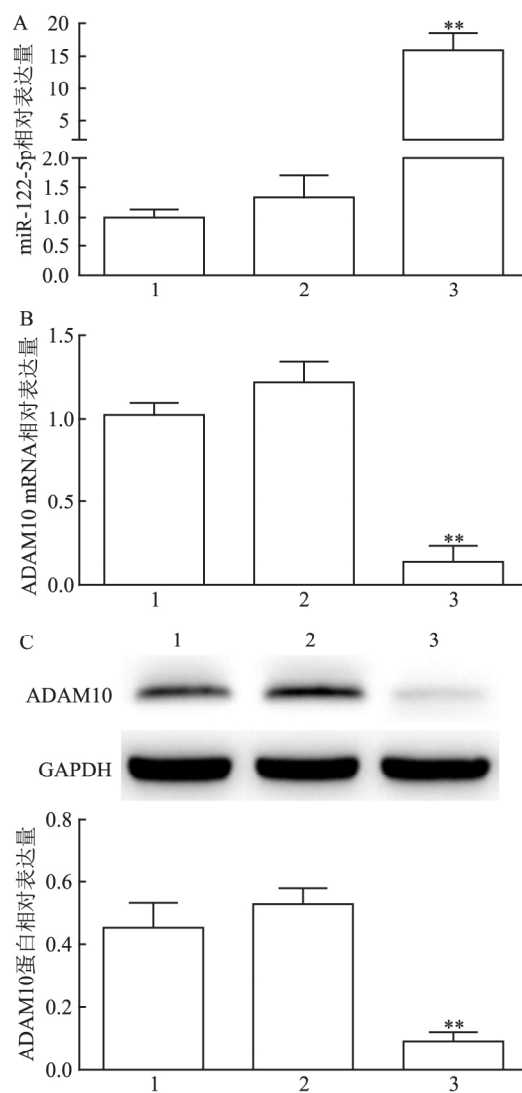


图1 miR-122-5p mimic 转染 SKOV-3 细胞后 miR-122-5p 和 ADAM10 的表达水平

A: 在转染 miR-122-5p mimic 的 SKOV-3 细胞中 miR-122-5p 的表达水平; B: 在转染 miR-122-5p mimic 的 SKOV-3 细胞中 ADAM10 基因的表达水平; C: ADAM10 蛋白的表达水平; 1: Blank 组; 2: mimic NC 组; 3: miR-122-5p 组; 与 mimic NC 组比较: ** $P < 0.01$

2.5 过表达 miR-122-5p 对 Notch 通路及 EMT 相关蛋白表达的影响 与 Blank 组相比,miR-122-5p mimic 组 SKOV-3 细胞中 Notch 通路相关蛋白 Notch1 蛋白及其下游蛋白 HES1 和 HEY1 表达水平降低 ($P < 0.01$); EMT 相关蛋白 Snail 和 N-cadherin 蛋白表达水平降低而 E-cadherin 蛋白表达水平升高

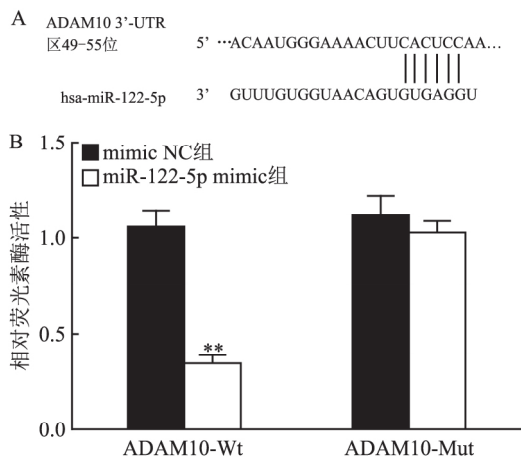


图2 双荧光素酶分析系统验证

miR-122-5p 和 ADAM10 mRNA 的靶向关系

A: miR-122-5p 与 ADAM10 的 3'-UTR 区靶向结合位点; B: 双荧光素酶报告系统验证 miR-122-5p 与 ADAM10 的 3'-UTR 区靶向结合; 与 mimic NC 组比较: ** $P < 0.01$

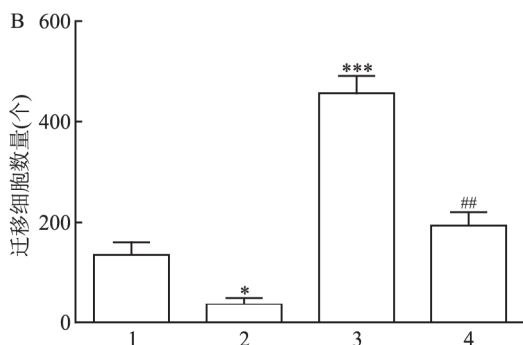
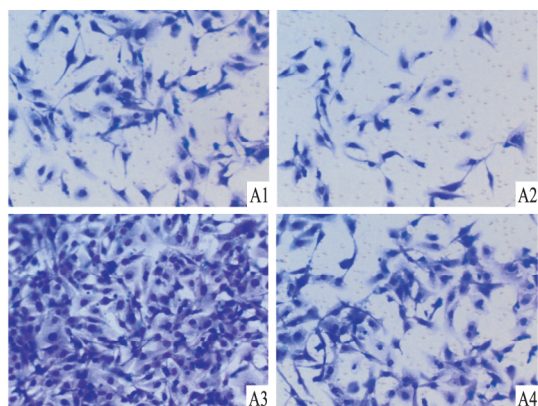


图3 Transwell 检测 SKOV-3 细胞的迁移能力变化

A: Transwell 法检测细胞迁移能力 结晶紫染色 $\times 200$; B: SK-OV-3 细胞迁移数量统计分析; 1: Blank 组; 2: miR-122-5p mimic 组; 3: pc-ADAM10 组; 4: miR-122-5p mimic + pc-ADAM10 组; 与 Blank 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与 pc-ADAM10 组比较: ## $P < 0.01$

($P < 0.05$); pc-ADAM10 组 SKOV-3 细胞中 Notch1、HES1、HEY1、Snail、N-cadherin 蛋白表达水平上升 ($P < 0.01$); E-cadherin 蛋白表达水平下降 ($P <$

0.01)。在 pc-ADAM10 组细胞共转染 miR-122-5p mimic 后, Notch 通路相关蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), Snail、N-cadherin 蛋白表达水平下降而 E-cadherin 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。见图 5。

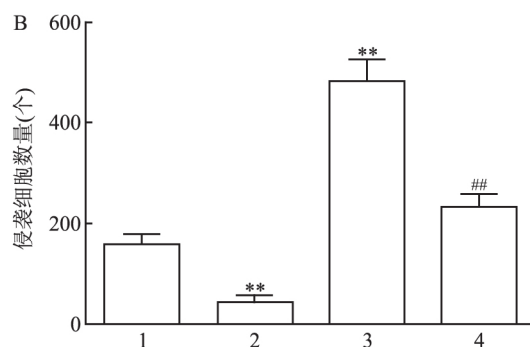
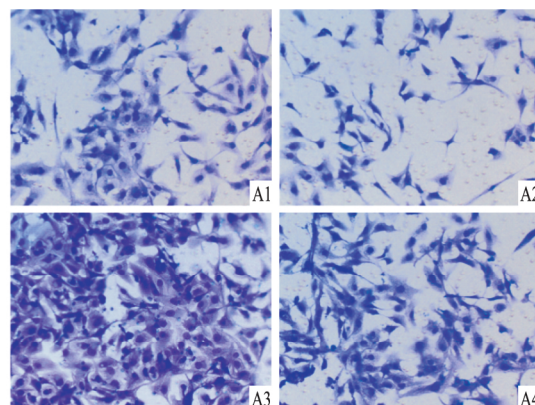


图4 Transwell 检测 SKOV-3 细胞的侵袭能力变化

A: Transwell 法检测细胞侵袭能力 结晶紫染色 $\times 200$; B: SK-OV-3 细胞侵袭数量统计分析; 1: Blank 组; 2: miR-122-5p mimic 组; 3: pc-ADAM10 组; 4: miR-122-5p mimic + pc-ADAM10 组; 与 Blank 组比较: ** $P < 0.01$; 与 pc-ADAM10 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

卵巢癌是一种以转移为特征的恶性肿瘤, 恶性程度高。目前, 越来越多的证据表明 EMT 在肿瘤转移中具有重要作用。在作用机制方面, miRNA 通过与靶基因的 3'非翻译区(3'-UTR)结合, 在转录后水平上负调控靶基因的表达水平。在作用功能方面, miRNAs 能调节不同类型癌细胞的 EMT。有研究^[5]表明, miR-448 通过直接靶向乳腺癌细胞 E-cadherin 抑制因子 Zeb1/2 进而抑制癌细胞 EMT 过程。胃癌中 miR-122-5p 能通过靶向双特异性磷酸酶 4 抑制胃癌的发展^[6]。这些数据表明 miR-122-5p 在人类癌症中具有多个靶点。还有研究^[7]表明, miR-122-5p 高表达能抑制胶质瘤的 EMT。本研究结果表明, miR-122-5p 通过靶向下调 ADAM10 表达抑制人卵

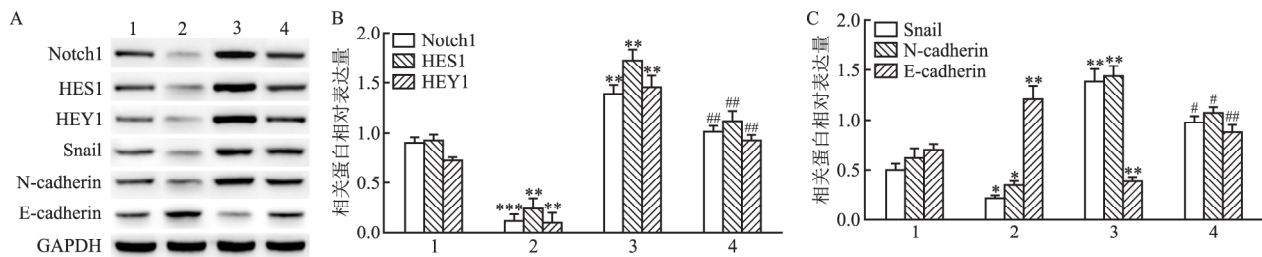


图5 Western blot 检测 SKOV-3 细胞 Notch 通路和 EMT 相关蛋白的表达水平

A: Western blot 检测蛋白表达量; B: Notch 通路相关蛋白表达量统计分析; C: EMT 相关蛋白表达量统计分析; 1: Blank 组; 2: miR-122-5p mimic 组; 3: pc-ADAM10 组; 4: miR-122-5p mimic + pc-ADAM10 组; 与 Blank 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 pc-ADAM10 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

巢癌细胞 SKOV-3 细胞的迁移侵袭以及 EMT。

miRNAs 具有抑癌和促癌功能,且与肿瘤转移有关。已有研究^[7-8]表明,miR-122-5p 能结合 lncRNA 进而抑制肝癌细胞的迁移、侵袭及 EMT。miR-122-5p 能通过调节特异性核基质结合区结合蛋白 1 (STAB1) 的表达抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭。本研究结果表明,miR-122-5p 通过靶向 ADAM10 抑制人卵巢癌细胞 SKOV-3 的迁移、侵袭以及 EMT,然而过表达 ADAM10 能逆转 miR-122-5p 对人卵巢癌细胞 SKOV-3 迁移与侵袭的抑制作用。提示 miR-122-5p 在人卵巢癌中可能作为一种抑癌因子,并通过靶向下调 ADAM10 表达而发挥抑癌作用。

ADAM 是一类含去整合素和金属蛋白酶结构域的蛋白质,它们在各种重要的生物细胞过程中的细胞-细胞、细胞-基质的相互作用中起着关键作用。Notch 信号通路中 α -分泌酶的作用主要涉及 ADAM10 和 ADAM17。ADAM10 是一种锌依赖的跨膜蛋白酶,能调节 Notch、EGF、E-cadherin 蛋白和其他信号通路。以往研究^[9-10]表明肾小管上皮细胞中 ADAM10 的过度表达增加了 E-cadherin 的表达水平,减少了细胞间的黏附,促进了上皮细胞的迁移能力。ADAM10 还能促进非小细胞肺癌细胞的 EMT。本研究结果显示 ADAM10 能促进人卵巢癌细胞 SKOV-3 的迁移侵袭以及 EMT。对 Notch 信号通路的研究^[11-13]表明 Notch 信号通路参与 EMT 相关转录因子的激活。miR-449a 通过与 mRNA 的 3'-UTR 结合抑制 Notch 途径调节 EMT,抑制肝癌细胞的迁移侵袭能力。阻断 Notch1 信号通路能有效抑制胃癌的转移。但有研究^[14]表明 Notch2 的缺失能激活 TRAF6/Akt 轴并促进鼻咽癌的转移。这些研究结果说明 Notch 信号通路对肿瘤 EMT 的作用具有两面性(促进和抑制)。本研究结果表明 miR-122-5p 通过降低 Notch 信号通路活性进而抑制人卵巢癌的

EMT 过程。ADAM10 通过激活 Notch 信号途径进而增强人卵巢癌 EMT。miR-122-5p 具有减轻 ADAM10 通过激活 Notch 信号途径促进人卵巢癌 EMT 的作用。

参考文献

- [1] Amankwah E K, Lin H Y, Tyrer J P, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) gene variants and epithelial ovarian cancer (EOC) risk [J]. Genet Epidemiol, 2015, 39(8): 689-97.
- [2] Yang Z, Li P F, Chen R C, et al. ADAM10-initiated release of Notch intracellular domain regulates microtubule stability and radial migration of cortical neurons [J]. Cereb Cortex, 2017, 27(2): 919-32.
- [3] Meng L, Chen Z, Jiang Z, et al. MiR-122-5p suppresses the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells by targeting LYN [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2020, 52(1): 49-57.
- [4] Zhang H, Xu S, Liu X. MicroRNA profiling of plasma exosomes from patients with ovarian cancer using high-throughput sequencing [J]. Oncol Lett, 2019, 17(6): 5601-7.
- [5] Ma P, Ni K, Ke J, et al. miR-448 inhibits the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells by directly targeting the E-cadherin repressor ZEB1/2 [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2018, 243(5): 473-80.
- [6] Xu X, Gao F, Wang J, et al. MiR-122-5p inhibits cell migration and invasion in gastric cancer by down-regulating DUSP4 [J]. Cancer Biol Ther, 2018, 19(5): 427-35.
- [7] Liu N, Wang Z, Liu D, et al. HOXC13-AS-miR-122-5p-SATB1-C-Myc feedback loop promotes migration, invasion and EMT process in glioma [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 7165-73.
- [8] Wan Y, Li M, Huang P. LINC01296 promotes proliferation, migration, and invasion of HCC cells by targeting miR-122-5p and modulating EMT activity [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 2193-203.
- [9] Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, et al. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(26): 9182-7.

- [10] Meng H , Huang Q , Zhang X , et al. MiR-449a regulates the cell migration and invasion of human non-small cell lung carcinoma by targeting ADAM10 [J]. *Onco Targets Ther* , 2019 , 12: 3829 – 38.
- [11] Nieszporek A , Skrzypek K , Adamek G , et al. Molecular mechanisms of epithelial to mesenchymal transition in tumor metastasis [J]. *Acta Biochim Pol* , 2019 , 66(4) : 509 – 20.
- [12] Han B , Huang J , Yang Z , et al. miR-449a is related to short-term recurrence of hepatocellular carcinoma and inhibits migration and invasion by targeting Notch1 [J]. *Onco Targets Ther* , 2019 , 12: 10975 – 87.
- [13] Peng X , Zhou J , Li B , et al. Notch1 and PI3K/Akt signaling blockers DAPT and LY294002 coordinately inhibit metastasis of gastric cancer through mutual enhancement [J]. *Cancer Chemother Pharmacol* , 2020 , 85(2) : 309 – 20.
- [14] Zou Y , Yang R , Huang M L , et al. NOTCH2 negatively regulates metastasis and epithelial-mesenchymal transition *via* TRAF6/AKT in nasopharyngeal carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res* , 2019 , 38(1) : 456.

Inhibition effect of miR-122-5p targeted ADAM10 regulates Notch signaling pathway on epithelial-mesenchymal transformation in human ovarian cancer SKOV-3 cells

Li Genlin , Liu Jie , Xie Jing , et al

(*Dept of Obstetrics and Gynecology , The First Affiliated Hospital of University of South China , Hengyang 421000*)

Abstract Objective To investigate the effects of miR-122-5p on epithelial-mesenchymal transformation(EMT) in human ovarian cancer SKOV-3 cells , and to elucidate its possible mechanism. **Methods** Human ovarian cancer SKOV-3 cells were cultured *in vitro* and transfected with miR-122-5p mimic and negative control(mimic NC) . Then the cells were divided into blank control group(Blank) , mimic NC group , and miR-122-5p mimic group. The expression of miR-122-5p and ADAM10 mRNA was detected by real-time fluorescence quantitative PCR(qRT-PCR) . Western blot was used to detect the expression of ADAM10 protein. Bioinformatics predicted the target matching of mir-122-5p and ADAM10 , and dual luciferase reporter system was used to verify the target relationship. In addition , miR-122-5p mimic and ADAM10-overexpressed plasmid(pcDNA-ADAM10) were respectively or simultaneously transfected into SKOV-3 cells , then the cells were divided into blank control group(Blank) , miR-122-5p mimic group , ADAM10 overexpression group(pc-ADAM10) and miR-122-5p mimic + pc-ADAM10 group. Transwell was used to detect the migration and invasion ability of SKOV-3 cells. Western blot was used to detect the expression of Notch signaling pathway related proteins Notch1 , HES1 and HEY1 , EMT related proteins Snail , E-cadherin and N-cadherin. **Results** Compared with mimic NC group , the expression of miR-122-5p of SKOV-3 cells in miR-122-5p mimic group increased($P < 0.01$) , indicating that miR-122-5p mimic was stably transfected into SKOV-3 cells. Compared with mimic NC group , the expression of ADAM10 mRNA and protein of SKOV-3 cells in miR-122-5p mimic group was lower($P < 0.01$) . ADAM10 was confirmed as a target gene of miR-122-5p by the dual luciferase reporter system. Compared with Blank group , the migration and invasion of SKOV-3 cells in miR-122-5p mimic group decreased($t = 6.004$, $P < 0.05$; $t = 7.289$, $P < 0.01$) , while that of pc-ADAM10 group increased($t = 13.181$, $P < 0.001$; $t = 11.504$, $P < 0.01$) ; the expression of Notch , HES1 , HEY1 , Snail and N-cadherin proteins were suppressed($P < 0.05$; $P < 0.01$) , while that of pc-ADAM10 group decreased ($P < 0.01$) . Compared with pc-ADAM10 group , miR-122-5p mimic + pc-ADAM10 group could alleviate the EMT promoting effect of pc-ADAM10 , and down-regulate the Notch signaling pathway activity. **Conclusion** miR-122-5p inhibits the EMT of human ovarian cancer SKOV-3 cells by blocking Notch signaling pathway , which may be related to miR-122-5p targeting inhibition of ADAM10 expression.

Key words human ovarian cancer SKOV-3 cells; epithelial-mesenchymal transformation; Notch signaling pathway; a disintegrin and metalloproteinase 10