

hsa-miR-206 过表达调节 MAPK 通路抑制卵巢癌细胞 CAOV3 生长及运动

徐 瑶¹, 邓晓杨², 张 勇^{1,3}, 吴 雯¹, 肖 琳¹, 张小虎¹

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.006

摘要 目的 探讨微小 RNA miR-206 对卵巢癌细胞 CAOV3 生长及运动特性影响及作用机制。方法 生物信息预测 miR-206 靶向基因, 荧光素酶实验验证其靶向关系。细胞分为 Control、miR-206 mimic、pc-MAPK1 及 miR-206 mimic + pc-MAPK1 组, qRT-PCR 检测 miR-206 表达, Brdu 染色检测细胞生长, Transwell 检测细胞侵袭, Western blot 法检测促分裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、上皮型钙黏附蛋白 (E-cadherin)、波形蛋白 (vimentin)、cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB)、磷酸化 CREB (P-CREB)、Ets 样转录因子-1 (Elk-1)、P-Elk-1、c-Myc、P-c-Myc 及血管内皮生长因子 (VEGF) 表达。建立经或未经 miR-206 转染的 CAOV3 细胞裸鼠皮下移植瘤, 测量移植瘤体积, qRT-PCR 检测 miR-206 及 MAPK1 表达水平, Western blot 法检测 Elk-1、P-Elk-1、原癌基因 (c-Myc) 及 P-c-Myc 表达, 免疫组化检测 Ki67 及 vimentin 表达。结果 miR-206 靶向抑制 MAPK1; 与 Control 组相比, miR-206 mimic 组 BrdU 阳性细胞百分比、侵袭细胞数降低 ($t = 4.27$, $P = 0.002$; $t = 3.43$, $P = 0.008$), E-cadherin 表达提高 ($t = 4.13$, $P = 0.003$), vimentin 表达、P-CREB/CREB、P-Elk-1/Elk-1 及 P-c-Myc/c-Myc 比值下调 ($t = 3.51$, $P = 0.007$; $t = 3.27$, $P = 0.010$; $t = 3.26$, $P = 0.010$; $t = 3.28$, $P = 0.010$)。miR-206 mimic 减小裸鼠皮下 CAOV3 细胞移植瘤体积 ($t = 6.51$, $P < 0.001$), 提高移植瘤组织中 miR-206 表达 ($t = 4.65$, $P = 0.001$), 降低 MAPK1 mRNA 水平、VEGF 表达、P-Elk-1/Elk-1 及 P-c-Myc/c-Myc 比值 ($t = 3.86$, $P = 0.004$; $t = 3.37$, $P = 0.009$; $t = 3.34$, $P = 0.009$; $t = 3.40$, $P = 0.008$), 减少 Ki67 及 Vimentin 阳性细胞百分比 ($t = 4.45$, $P = 0.002$; $t = 4.22$, $P = 0.002$)。结论 过表达 miR-206 可通过阻碍 MAPK 通路活化抑制卵巢癌 CAOV3 细胞生长及运动。

关键词 miR-206; 卵巢癌; MAPK 通路; 生长; 运动

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)06-0848-07

2020-04-11 接收

基金项目: 四川省教育厅自然科学重点项目 (编号: 17ZA0128)

作者单位: ¹西南医科大学附属医院/成都医学院第一附属医院妇科, 泸州 646000

²成都医学院第一附属医院妇科 成都 610500

³绵阳市中心医院妇产科 绵阳 621000

作者简介: 徐 瑶, 女, 本科, 主治医师;

张 勇, 男, 主任医师, 教授, 责任作者, E-mail: 13808110138@163.com

卵巢癌是一类发病率较高的妇科恶性肿瘤, 死亡率在妇科恶性肿瘤中居首^[1]。调查^[2]显示, 约 65% 的卵巢癌患者处于癌症晚期, 经手术及放化疗后仍预后不良, 5 年生存率 $\leq 30\%$ 。此外, 近年来卵巢癌患者趋于低龄, 卵巢癌发病率逐年递增^[3], 因此寻找有效治疗方法显得十分迫切。微小 RNA miR-206 在卵巢癌中发挥抑癌作用, 可抑制癌细胞的生长和癌组织的转移^[4]。而 miR-206 在卵巢癌中的抑癌机制还有待进一步研究。因此, 该文通过上调 miR-206, 对其在卵巢癌细胞 CAOV3 中的作用机制进行了深入探究, 为 miR-206 靶向治疗卵巢癌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂 卵巢癌细胞 CAOV3 购自美国典型培养物保藏中心; 荧光素酶系统检测试剂盒、反转录试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒和 Lipofectamine2000 转染试剂盒均购自美国 Thermo Fisher 公司; TRIzol 及 Opti-MEM 均购自美国 Invitrogen 公司; miR-206 mimic 和 pc-MAPK1 质粒由上海生工生物设计并合成; Brdu 试剂盒购自瑞士 Roche 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司; 促分裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen activated protein kinase 1, MAPK1)、上皮型钙黏附蛋白 (epithelial calcium adhesive protein, E-cadherin)、波形蛋白 (vimentin)、cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP reactive element binding protein, CREB)、P-CREB、Ets 样转录因子-1 (Ets-like transcription factor-1, Elk-1)、P-Elk-1、原癌基因 (proto-oncogene, c-Myc) 及 P-c-Myc 兔来源单克隆一抗抗体购自美国 Abcam 公司; 实验所用二抗均购自上海博士德生物公司; RPMI 1640 培养液、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司, 青霉素、链霉素、RIPA 裂解液、DAPI 及 BCA 试剂盒购自上海碧云天公司。

1.2 细胞培养与分组转染 体积分数 10% FBS、

100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 RPMI 1640, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养。细胞传代次日换液, 融合率达到 85% 时, 以 1×10^4 个/ml 的浓度再次传代。将细胞分为 Control、miR-206 mimic、pc-MAPK1 及 miR-206 mimic + pc-MAPK1 组, 根据 Lipofectamine 2000 说明书将 miR-206 mimic 质粒、pc-MAPK1 质粒分别或联合转染进入 miR-206 mimic、pc-MAPK1 及 miR-206 mimic + pc-MAPK1 组 CAOV3 细胞, Control 组加入等量空载。转染 6 h 后换液, 用于后续研究。

1.3 qRT-PCR 检测 miR-206 及 MAPK1 mRNA 水平 将经或未经 miR-206 转染的 CAOV3 细胞及其移植瘤组织中加入 TRIzol 于通风橱中裂解, 参考 Thermo Fisher 总 RNA 提取试剂盒说明书进行抽提, 将得到的总 RNA 进行定量分析, 每组取等量 RNA 反转录为 cDNA, 利用实时定量 PCR 试剂盒配制 PCR 体系进行 PCR 扩增, 得到阈值 ΔCt , 以对照组 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 平均值为基准 1, 实验组 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 平均值与对照组 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 平均值相比得到的 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 为相对变化倍数。

1.4 Brdu 检测 CAOV3 细胞增殖 1.2 中各组细胞以 1.5×10^5 个/ml 的浓度接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ Brdu 孵育 8 h, PBS 洗去未结合 Brdu, 以含 95% 乙醇、5% 冰乙酸的固定液固定细胞, 洗涤后加入 Brdu 单抗 (1 : 1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 二抗 (1 : 200) 室温避光孵育 1 h。洗涤后 DAPI 复染细胞核, 荧光显微镜观察并计数。

1.5 Transwell 检测 CAOV3 细胞侵袭 Matrigel 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 预先融化, 取少量融化 Matrigel 到 Transwell 小室中预包被。接种 1.2 中各组细胞于上室中, 用无血清培养液进行培养。24 h 后, 棉签拭去滤膜上层未迁移细胞, HE 染色液对迁移下层细胞进行染色并计数。

1.6 Western blot 法检测相关蛋白表达 RIPA 裂解液提取 1.2 中各组细胞总蛋白, BCA 试剂盒进行定量并调平, 取各组蛋白 30 μg , 质量分数为 10% SDS-PAGE 将其分离, 半干转膜法将其转移到 PVDF 膜上, 脱脂奶粉 2 h 室温封闭, 一抗 (GAPDH: 1 : 1 000, MAPK1: 1 : 1 000, vimentin: 1 : 1 000, E-cadherin: 1 : 1 000, P-CREB: 1 : 1 000, CREB: 1 : 1 000, P-Elk-1: 1 : 1 000, Elk-1: 1 : 1 000, P-c-Myc: 1 : 500, c-Myc: 1 : 500) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔单克隆二抗 (1 : 2 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 最后曝光显色并以 GAPDH 为内参。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 22.0 对数据进行统计学分析, 所有实验均重复 3 次。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表

示, 多组数据比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 student t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

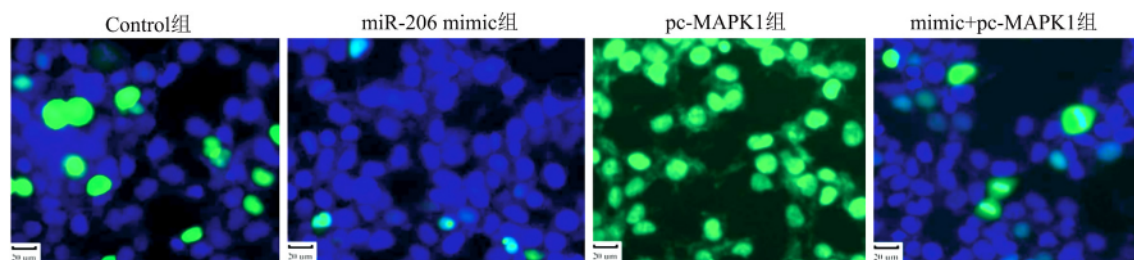
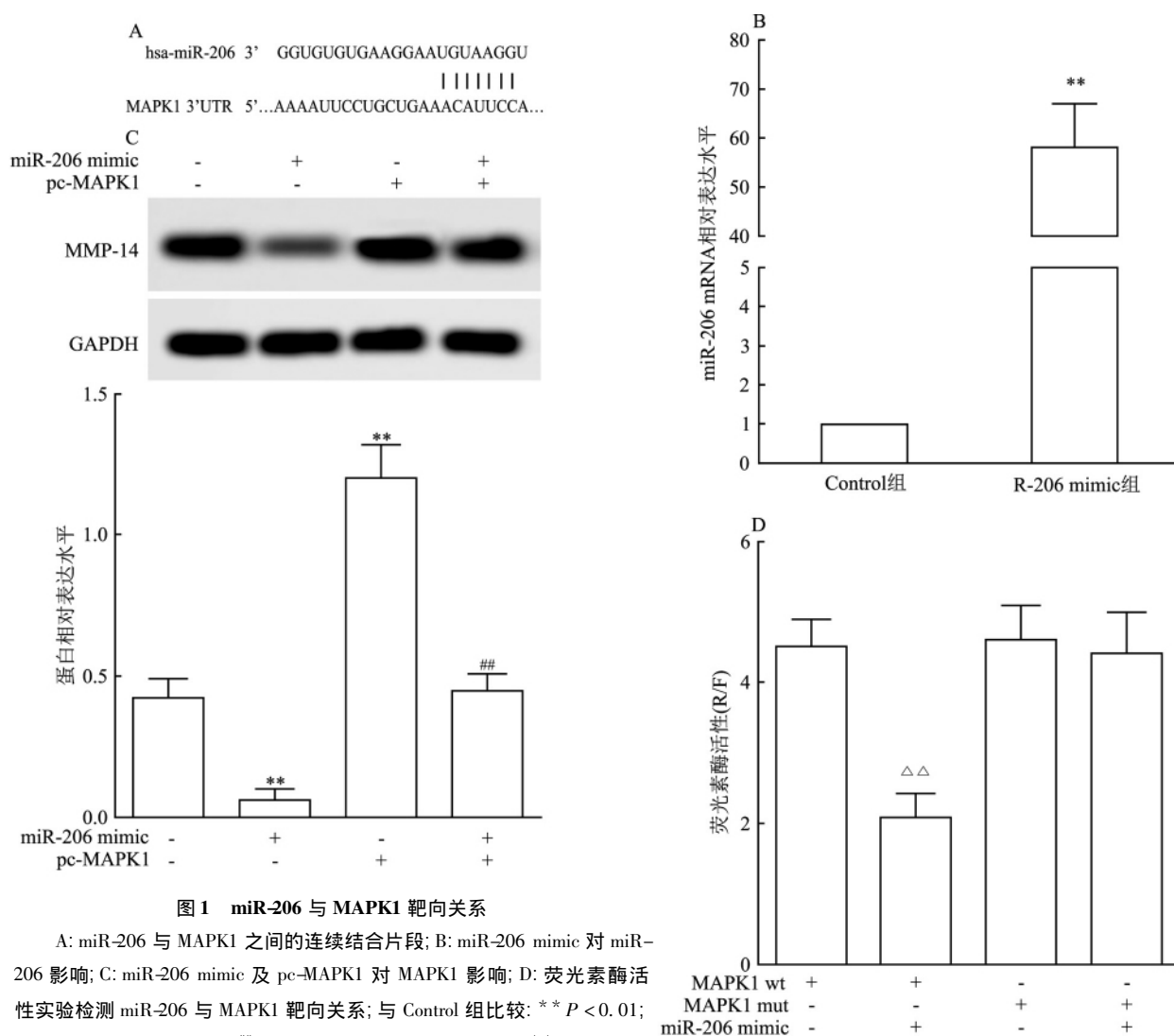
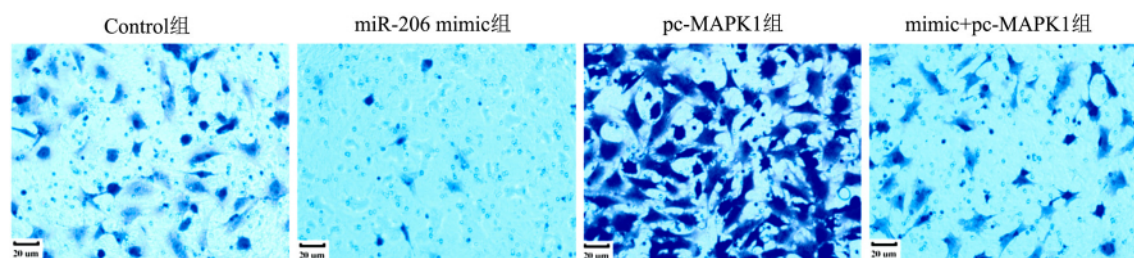
2 结果

2.1 hsa-miR-206 与 MAPK1 靶向关系 生物信息网站 TargetScan 预测 hsa-miR-206 与 MAPK1 之间存在潜在靶向关系。与 Control 组相比, miR-206 mimic 组 miR-206 表达上调 ($t = 4.86$, $P < 0.001$)。各组间 MAPK1 表达水平差异有统计学意义 ($F = 338.125$, $P = 0.003$); 与 Control 组相比, miR-206 mimic 组 MAPK1 表达下调 ($t = 3.34$, $P = 0.009$), pc-MAPK1 组 MAPK1 表达上调 ($t = 3.38$, $P = 0.008$); 与 miR-206 mimic 组比较, mimic + pc-MAPK1 组 MAPK1 表达上调 ($t = 3.35$, $P = 0.009$)。各组间荧光素酶活性差异有统计学意义 ($F = 187.364$, $P = 0.006$); 转染 miR-206 mimic 可降低 MAPK1 wt 的荧光素酶活性, 而对两者结合位点突变的 MAPK1 mut 没有影响。见图 1。

2.2 miR-206 mimic 及 pc-MAPK1 对 CAOV3 细胞增殖影响 4 组间荧光素酶活性差异有统计学意义 ($F = 543.297$, $P = 0.000$); 与 Control 组 BrdU 阳性细胞百分比 (68.12 ± 9.23) % 比较, miR-206 mimic 组 BrdU 阳性细胞百分比 (9.54 ± 5.12) % 下降 ($t = 4.27$, $P = 0.002$), pc-MAPK1 组 BrdU 阳性细胞百分比 (94.34 ± 6.27) % 上升 ($t = 3.45$, $P = 0.008$)。与 miR-206 mimic 组 BrdU 阳性细胞百分比 (9.54 ± 5.12) % 比较, miR-206 mimic + pc-MAPK1 组 BrdU 阳性细胞百分比 (56.62 ± 7.13) % 上升 ($t = 4.11$, $P = 0.003$)。见图 2。

2.3 miR-206 mimic 及 pc-MAPK1 对 CAOV3 细胞侵袭影响 4 组间荧光素酶活性差异有统计学意义 ($F = 621.377$, $P = 0.000$); 与 Control 组侵袭细胞数 (55.12 ± 9.23) 比较, miR-206 mimic 组侵袭细胞数 (11.14 ± 5.17) 减少 ($t = 3.43$, $P = 0.008$), pc-MAPK1 组侵袭细胞数 (164.22 ± 23.21) 增多 ($t = 3.52$, $P = 0.007$)。与 miR-206 mimic 组侵袭细胞数 (11.14 ± 5.17) 比较, miR-206 mimic + pc-MAPK1 组侵袭细胞数 (45.32 ± 9.11) 增多 ($t = 3.33$, $P = 0.009$)。见图 3。

2.4 miR-206 mimic 及 pc-MAPK1 对 CAOV3 细胞上皮间充质转化影响 4 组间 E-cadherin 表达量和 vimentin 表达差异均有统计学意义 ($F = 623.764$, $P = 0.000$; $F = 889.463$, $P = 0.000$)。与 Control 组

图2 BrdU 染色检测各组 CAOV3 细胞增殖情况 BrdU $\times 400$ 图3 Transwell 检测各组 CAOV3 细胞侵袭情况 结晶紫 $\times 400$

比较 miR-206 mimic 组细胞中 E-cadherin 表达增加 ($t = 4.13$, $P = 0.003$)、vimentin 表达减少 ($t = 3.51$, $P = 0.007$)。pc-MAPK1 组 E-cadherin 表达减少 ($t = 3.27$, $P = 0.010$)、vimentin 表达增加 ($t = 3.31$, $P = 0.009$)。与 miR-206 mimic 组比较, miR-206 mimic + pc-MAPK1 组 E-cadherin 表达减少 ($t = 4.02$, $P = 0.003$)、vimentin 表达增加 ($t = 3.36$, $P = 0.009$)。见图 4。

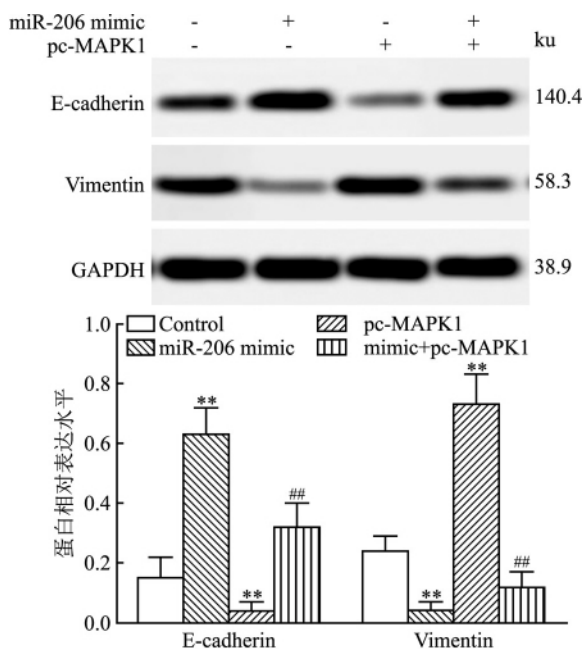


图 4 Western blot 法检测各组

CAOV3 细胞 vimentin 和 E-cadherin 蛋白表达

与 Control 组比较: ** $P < 0.01$, 与 miR-206 mimic 组比较: ## $P <$

0.01

2.5 miR-206 mimic 及 pc-MAPK1 对 CAOV3 细胞 MAPK 信号通路的影响 各组间 P-CREB/CREB、P-Elk-1/Elk-1、P-c-Myc/c-Myc 表达量比值差异有统计学意义 ($F = 468.392$, $P = 0.000$; $F = 143.674$, $P = 0.001$; $F = 697.314$, $P = 0.000$)。与 Control 组比较, miR-206 mimic 组细胞中 P-CREB/CREB、P-Elk-1/Elk-1 及 P-c-Myc/c-Myc 比值降低 ($t = 3.27$, $P = 0.010$; $t = 3.26$, $P = 0.010$; $t = 3.28$, $P = 0.010$)。pc-MAPK1 组 P-CREB/CREB、P-Elk-1/Elk-1 及 P-c-Myc/c-Myc 比值升高 ($t = 3.31$, $P = 0.009$; $t = 3.29$, $P = 0.010$; $t = 3.34$, $P = 0.009$)。与 miR-206 mimic 组比较, miR-206 mimic + pc-MAPK1 组 P-CREB/CREB、P-Elk-1/Elk-1 及 P-c-Myc/c-Myc 比值升高 ($t = 3.27$, $P = 0.010$; $t = 3.28$, $P = 0.010$; $t = 3.29$, $P = 0.010$)。见图 5。

2.6 miR-206 mimic 对 CAOV3 细胞裸鼠皮下移

植瘤影响 与 Control 组裸鼠皮下移植瘤体积 (2134.26 ± 199.33) mm^3 比较, miR-206 mimic 组 (496.21 ± 187.13) mm^3 减小 ($t = 6.51$, $P < 0.001$)。与 Control 组相比, miR-206 mimic 组移植瘤组织中 miR-206 表达增加 ($t = 4.65$, $P = 0.001$)、MAPK1 mRNA 水平降低 ($t = 3.86$, $P = 0.004$)、miR-206 mimic 组 VEGF 表达及 P-Elk-1/Elk-1 及 P-c-Myc/c-Myc 比值降低 ($t = 3.37$, $P = 0.009$; $t = 3.34$, $P = 0.009$; $t = 3.40$, $P = 0.008$)、Ki67 及 Vimentin 阳性细胞百分比减少 ($t = 4.45$, $P = 0.002$; $t = 4.22$, $P = 0.002$)。见图 6。

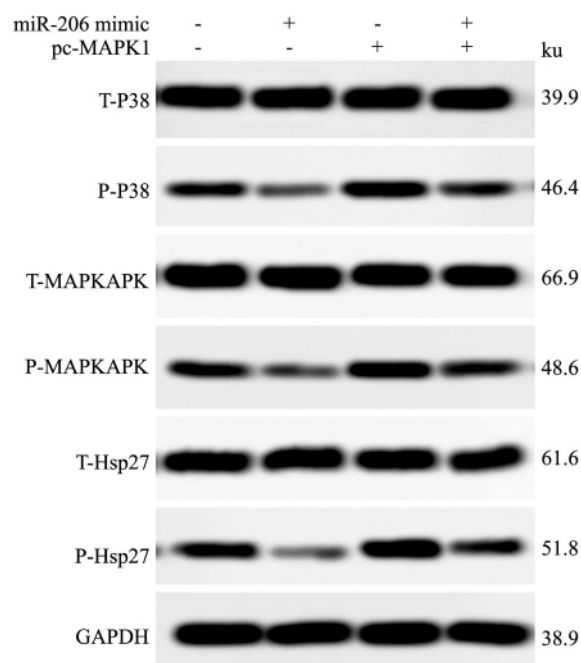


图 5 Western blot 法检测各组 CAOV3 细胞 P-CREB/CREB、P-Elk-1/Elk-1 及 P-c-Myc/c-Myc 水平

与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 miR-206 mimic 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

miRNA 是一类用于调节靶基因表达的小型单链非编码 RNA, 在各种细胞增殖、分化、发育和凋亡过程中发挥着至关重要的作用。miR-206 作为一类抗癌基因, 在卵巢癌细胞中被下调, 上调 miR-206 表

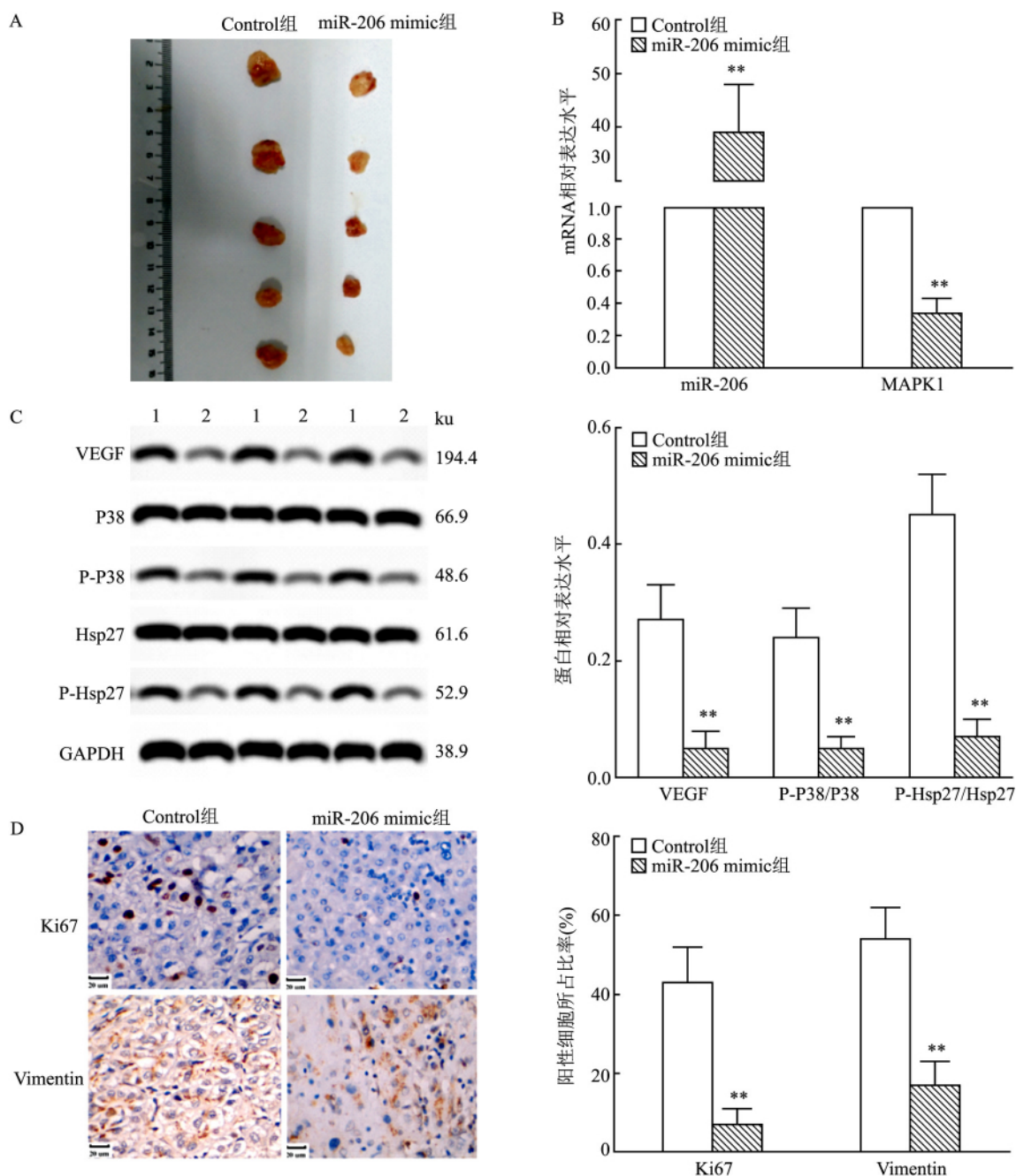


图6 miR-206 mimic对CAOV3细胞裸鼠皮下移植瘤的影响

A: CAOV3细胞移植瘤照片; B: Western blot法检测VEGF、P-Elk-1/Elk-1及P-c-Myc/c-Myc水平; C: qRT-PCR检测miR-206及MAPK1 mRNA水平; 1: Control组; 2: miR-206 mimic组; D: 免疫组化检测Ki67和vimentin表达 ×200; 与Control组比较: ** $P < 0.01$

达可抑制卵巢癌发生发展^[5]。miR-206可调节多个基因表达,在乳腺癌中,miR-206可靶向下调烟酰胺磷酸核糖转移酶、转化生长因子及T-box录因子^[6];在胃癌中,miR-206可降低c-Met、周期蛋白依赖性激酶4及MAPK1的表达水平^[7]。本研究利用生物信息预测显示,在CAOV3细胞中miR-206可靶向下调MAPK1表达。

过度增殖及侵袭迁移是癌细胞的生长特性,降低癌细胞增殖及侵袭能力可抑制癌组织生长转移。

研究^[6]表明,miR-206可靶向下调多个促癌基因,抑制癌细胞增殖及侵袭。在肾细胞癌中,miR-206通过抑制细胞周期蛋白G相关激酶表达,降低癌细胞增殖及侵袭能力^[8];在卵巢癌中,miR-206抑制其靶蛋白细胞周期蛋白D1及D2表达,阻碍癌组织的生长转移^[5]。在本文中,在卵巢癌细胞CAOV3中,miR-206可通过靶向下调MAPK1抑制细胞的增殖及侵袭。

上皮间充质转化是促进癌细胞侵袭迁移的重要

因素之一,其在蛋白水平上主要表现为 E-cadherin 表达减少,Vimentin 表达增加。细胞黏附蛋白 E-cadherin 定位于上皮细胞中,主要维持细胞极性及完整性,是细胞增殖和侵袭的抑制因子^[9]。波形蛋白 Vimentin 是上皮间充质转化过程中的关键蛋白,可作为上皮间充质转化的经典标记物,在上皮间充质转化过程中,细胞骨架组分由以角蛋白为主转变为以波形蛋白为主^[10]。本研究表明,miR-206 可通过靶向下调 MAPK1 阻碍 CAOV3 细胞上皮间充质转化。

MAPK1 信号通路在癌症形成过程中发挥重要作用,如在子宫内膜癌中,MAPK1 过度激活可促进癌细胞的增殖侵袭及迁移^[11]。据报道^[12],在卵巢癌中,抑制 MAPK1 表达可提高癌细胞对铂类化合物的敏感性。cAMP 反应元件结合蛋白 CREB、Ets 样转录因子 Elk-1 及原癌基因 c-Myc 均为 MAPK1 的下游蛋白,CREB 是转录增强因子,主要定位于细胞核中,当其被 MAPK1 磷酸化激活后可促进 MAPK1 靶基因的转录^[13]; Elk-1 是促癌基因,可通过调节细胞外基质相关酶的转录在癌组织浸润转移和血管形成中发挥重要作用^[14]; c-Myc 具有的增殖效应,能使细胞具有无限增殖的能力,可促进多种癌症发生发展^[15]。实验结果表明,miR-206 可通过靶向下调 MAPK1 抑制 MAPK1 信号通路的激活。

综上所述,miR-206 过表达通过靶向下调 MAPK1 抑制 MAPK1 信号通路来抑制卵巢癌细胞 CAOV3 生长及运动,这为靶向治疗卵巢癌提供新的靶点。但是具体分子机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 谭丽珊,陈玉英,余健华,等. 沉渣包埋法在卵巢肿瘤手术盆腔冲洗液细胞学诊断中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2018, 10(3): 153-7.
- [2] Knutson K L, Karyampudi L, Lamichhane P, et al. Retraction note: Targeted immune therapy of ovarian cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(3): 489.
- [3] Zhang X, Wang S, Zhao S, et al. Postoperative chemotherapy had no prognostic effect on early-staged young ovarian cancer with unilateral resection[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(11): 5488-96.
- [4] Dai C, Xie Y, Zhuang X, et al. miR-206 inhibits epithelial ovarian cancer cells growth and invasion via blocking c-Met/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104(2): 763-70.
- [5] Chang L, Guo R, Yuan Z, et al. LncRNA HOTAIR regulates CCND1 and CCND2 expression by sponging miR-206 in ovarian cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(4): 1289-303.
- [6] Hesari Z, Nourbakhsh M, Hosseinkhani S, et al. Down-regulation of NAMPT expression by mir-206 reduces cell survival of breast cancer cells[J]. *Gene*, 2018, 67(3): 149-58.
- [7] Zheng Z, Yan D, Chen X, et al. MicroRNA-206: effective inhibition of gastric cancer progression through the c-Met pathway[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0128751.
- [8] Wei C, Wang S, Ye Z Q, et al. miR-206 inhibits renal cell cancer growth by targeting GAK[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2016, 36(6): 852-8.
- [9] 黎超莲,邹嘉雯,李荣威,等. HOXA5、E-cadherin、 β -catenin 在卵巢癌组织中的表达[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 7(7): 1092-6.
- [10] 年士艳,冯磊. miR-548c-3p 通过调控 TRIM59 表达对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(4): 283-9.
- [11] Chang L, Zhang D, Shi H, et al. MiR-143 inhibits endometrial cancer cell proliferation and metastasis by targeting MAPK1[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(48): 84384-95.
- [12] Xu Z H, Yao T Z, Liu W. miR-378a-3p sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin through targeting MAPK1/GRB2[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 10(7): 1410-7.
- [13] Chen Z, Li J L, Lin S, et al. cAMP/CREB-regulated LINC00473 marks LKB1-inactivated lung cancer and mediates tumor growth[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(6): 2267-79.
- [14] Xu Z, Zhu C, Chen C, et al. CCL19 suppresses angiogenesis through promoting miR-206 and inhibiting Met/ERK/Elk-1/HIF-1 α /VEGF-A pathway in colorectal cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 974.
- [15] 俞今晶,来纯云. c-Myc 在肿瘤中的表达及功能[J]. 国际肿瘤学杂志, 2017, 44(4): 278.

Overexpression of hsa-miR-206 inhibits the growth and movement of ovarian cancer cell CAOV3 by regulating the MAPK pathway

Xu Yao¹, Deng Xiaoyang², Zhang Yong^{1,3}, et al

(¹Dept of Gynecology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University/The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Luzhou 646000; ²Dept of Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500; ³Dept of Obstetrics and Gynecology, Mianyang Central Hospital, Mianyang 621000)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of microRNA miR-206 on the growth and motility of ovarian cancer cell CAOV3. **Methods** The targeted gene of miR-206 was predicted by bioinformatics and its targeted-relationship were confirmed by the luciferase reporter assay. Cells were divided into Control, miR-206 mimic,

网络出版时间: 2020/5/29 13:02 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200527.1642.007.html>

沉默 FGL1 对肺腺癌细胞吉非替尼药物敏感性的影响

高薇薇, 孙翠兰, 郝吉庆

摘要 目的 研究沉默纤维蛋白原样蛋白 1(FGL1)对肺腺癌细胞吉非替尼药物敏感性的影响。方法 实时荧光定量 PCR 及 Western blot 法检测 FGL1 在肺腺癌吉非替尼敏感细胞株 PC9 与吉非替尼耐药细胞株 PC9/GR 中差异性表达;然后在吉非替尼耐药株 PC9/GR 中沉默 FGL1 表达;CCK-8 实验检测各组细胞增殖情况;流式细胞术测定各组细胞总凋亡率;Western blot 实验测定各组凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 及 Cleaved-Caspase-3 的表达水平。结果 FGL1 在 PC9/GR 细胞中呈高表达;沉默 FGL1 可抑制 PC9/GR 的增殖,且提高了 PC9/GR 细胞凋亡率($P < 0.05$);Western blot 表明,Caspase-3 在各组细胞中表达差异无统计学意义($P > 0.05$);与 PC9/GR 组比较,吉非替尼组 Bax、Bcl-2 表达无明显

差异,而 Cleaved-Caspase-3 表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。沉默 FGL1 后,Bcl-2 蛋白表达下调,Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 沉默 FGL1 可增强肺腺癌耐药细胞对吉非替尼的敏感性,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,FGL1 可能是治疗表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKIs)耐药性患者的一个潜在靶点。

关键词 肺腺癌;纤维蛋白原样蛋白 1;EGFR-TKIs 耐药;吉非替尼药物敏感性

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)06-0854-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.007

2020-03-27 接收

基金项目:安徽省 2018 年度重点研究与开发计划项目(编号:1804h08020240)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科,合肥 230022

作者简介:高薇薇,女,硕士研究生;

郝吉庆,女,副教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: ayfy_hjq@163.com

肺癌发病率逐年上升,已成为全世界癌症相关死亡的主要原因之一^[1]。非小细胞肺癌(non small lung cancer, NSCLC)是最常见的肺癌病理类型,约占总数的 85%,而其中肺腺癌为最主要的病理类型。近年来,随着对分子靶向药物的深入研究,酪氨

pc-MAPK1 and miR-206 mimic + pc-MAPK1 group, the expression of miR-206 was measured by qRT-PCR, cell growth was measured by Brdu staining, cell invasion was measured by Transwell, the expression of Mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), epithelial cadherin (E-cadherin), vimentin (vimentin), cAMP response element binding protein (CREB), phosphorylated CREB (P-CREB), Ets-like Transcription factor-1 (Elk-1), P-Elk-1, proto-oncogene (c-Myc), P-c-Myc and vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured by Western blot. Subcutaneous xenograft tumors of nude mice with miR-206 transfected or non-transfected CAOV3 cells were established. The volume of the transplanted tumors was measured. The expression levels of miR-206 and MAPK1 were detected by qRT-PCR. The expression levels of Elk-1, P-Elk-1, c-Myc and Pc-Myc expression was detected by Western blot. Ki67 and vimentin expression were detected by immunohistochemistry. **Results** miR-206 targeted the inhibition of MAPK1 expression. Compared with the control group, the percentage of BrdU positive cells and the number of invasive cells in the miR-206 mimic group reduced ($t = 4.27$, $P = 0.002$; $t = 3.43$, $P = 0.008$), the expression of E-cadherin increased ($t = 4.13$, $P = 0.003$), P-CREB/CREB, P-Elk-1/Elk-1, Pc-Myc/c-Myc ratios and the expression of vimentin were down-regulated ($t = 3.27$, $P = 0.010$; $t = 3.26$, $P = 0.010$; $t = 3.28$, $P = 0.010$; $t = 3.51$, $P = 0.007$). miR-206 mimic reduced the volume of subcutaneously transplanted tumors of CAOV3 cells in nude mice ($t = 6.51$, $P < 0.001$), increased the expression of miR-206 in the tissues of transplanted tumors ($t = 4.65$, $P = 0.001$), reduced MAPK1 mRNA levels, VEGF expression, P-Elk-1/Elk-1 and Pc-Myc/c-Myc ratio ($t = 3.86$, $P = 0.004$; $t = 3.37$, $P = 0.009$; $t = 3.34$, $P = 0.009$; $t = 3.40$, $P = 0.008$), and reduced the percentage of Ki67 and Vimentin positive cells ($t = 4.45$, $P = 0.002$; $t = 4.22$, $P = 0.002$). **Conclusion** miR-206 over expression can inhibit ovarian carcinoma cell CAOV3 growth and mobility via obstructed activation of MAPK signal pathway.

Key words miR-206; ovarian carcinoma; MAPK signal pathway; growth; movement