

# miRNA-145 在卵巢癌组织中的表达及其对增殖、迁移与侵袭的影响

陈梅<sup>1</sup>, 钟颖<sup>1</sup>, 明建中<sup>2</sup>

(1.南方科技大学医院,广东深圳 518055;2.广东医学院附属深圳南山医院,广东深圳 518052)

**摘要:** [目的] 检测不同卵巢组织中 miRNA-145 的表达,并探讨 miRNA-145 在卵巢细胞 SKOV-3 增殖、迁移与侵袭的作用。 [方法] 采用定量聚合酶链反应 (qPCR) 测定正常卵巢组织、卵巢癌旁组织与卵巢癌组织的 miRNA-145 表达水平,随机将 SKOV-3 细胞分为正常对照组、空白病毒组和病毒转染组,分别采用 MTT 法测定各组细胞的增殖情况,采用 qPCR 测定 miRNA-145 的表达水平,采用划痕实验测定迁移能力,采用 Transwell 小室法测定侵袭能力。 [结果] 卵巢癌组织 miRNA-145 表达水平为  $0.56 \pm 0.23$ ,较卵巢癌旁组织和正常卵巢组织显著性降低 ( $P < 0.05$ )。卵巢癌组织 miRNA-145 表达水平与患者国际妇产科联合会分期和组织分化程度相关 ( $P < 0.05$ ),但与年龄无关 ( $P > 0.05$ )。病毒转染组细胞的 miRNA-145 表达水平为  $4.63 \pm 0.47$ ,较正常对照组和空白病毒对照组显著性增加 ( $P < 0.05$ )。病毒转染组细胞在培养 24h、48h 和 72h 时 OD 值分别为  $0.68 \pm 0.15$ 、 $1.17 \pm 0.23$  和  $1.62 \pm 0.26$ ,均较正常对照组和空白病毒对照组显著性降低 ( $P < 0.05$ )。病毒转染组细胞的划痕宽度为  $675 \pm 46 \mu\text{m}$ ,较正常对照组和空白病毒对照组显著性增大 ( $P < 0.05$ )。病毒转染组穿膜细胞数量为  $36 \pm 6$  个,较正常对照组和空白病毒对照组显著性降低 ( $P < 0.05$ )。 [结论] miRNA-145 低表达可能与卵巢癌的发生发展有关,过表达 miRNA-145 能够抑制卵巢癌细胞株的增殖、迁移和侵袭。miRNA-145 可以作为治疗卵巢癌的新作用靶点。

**关键词:** miRNA-145; 卵巢癌; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞侵袭

**中图分类号:** R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)07-0607-05

**doi:** 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.07.B004

## Expression of miRNA-145 in Ovarian Cancer and Its Effect on Proliferation, Migration and Invasion

CHEN Mei<sup>1</sup>, ZHONG Ying<sup>1</sup>, MING Jian-zhong<sup>2</sup>

(1. South University of Science and Technology Hospital, Shenzhen 518055, China;

2. Nanshan Hospital Affiliated to Guangdong Medical College, Shenzhen 518052, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the expression of miRNA-145 in ovarian carcinoma and its effect on cell proliferation, migration and invasion. [Methods] Expression of miRNA-145 in normal ovarian tissue, the tissue adjacent to ovarian cancer and ovarian cancer was determined by qRT-PCR. Human ovarian cancer SKOV-3 cells were transfected with miRNA-145-mimic(miRNA-145 group) or blank viral vector (miRNA-145-NC group), and the untransfected SKOV-3 cells served as control group. Cell proliferation was determined by MTT method, expression of miRNA-145 were determined by qRT-PCR, cell migration was determined by scratch experiment, and cell invasion was determined by Transwell small chamber method. [Results] The expression level of miRNA-145 in ovarian cancer tissue was  $0.56 \pm 0.23$ , which was significantly lower than that in pericancerous ovarian tissue and normal ovarian tissue ( $P < 0.05$ ). The miRNA-145 expression level in ovarian cancer tissue was correlated with FIGO stages and differentiation degrees ( $P < 0.05$ ), but not correlated with the age of patients ( $P > 0.05$ ). Expression level of miRNA-145 in miRNA-145 group was  $4.63 \pm 0.47$ , which was significantly higher than that in normal control group and miRNA-145-NC group ( $P < 0.05$ ). OD values in miRNA-145 group after incubation for 24h, 48h and 72h were  $0.68 \pm 0.15$ ,  $1.17 \pm 0.23$  and  $1.62 \pm 0.26$ , which were significantly lower than those in normal control group and miRNA-145-NC group after incubation for 24h, 48h and 72h ( $P < 0.05$ ). Scratch width of cells in miRNA-145 group was  $675 \pm 46 \mu\text{m}$ , which was significantly larger than that in normal control group and miRNA-145-NC group ( $P < 0.05$ ). Quantity of transfected cells in miRNA-145 group was  $36 \pm 6$ , which was significantly lower than that in normal control group and miRNA-145-NC group ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] Decreased expression of miRNA-145 may be associated with occurrence and development of ovarian cancer, over-expression of miRNA-145 can inhibit the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells. miRNA-145 might be used as a new target for treatment of ovarian cancer.

**Subject words:** miRNA-145; ovarian cancer; cell proliferation; cell migration; cell invasion

**通信作者:** 明建中, 主任医师, 博士; 广东医学院附属深圳南山医院影像科, 广东省深圳南山区桃源路 89 号 (518052); E-mail: 13602687310@163.com

**收稿日期:** 2018-07-05; **修回日期:** 2018-08-01

miRNA 是近年来新发现的一类内源性非编码小 RNA 分子,由 20~24 个核苷酸组成。miRNA 具有生物学调节功能,与细胞分裂、增殖、分化、发育等生物学过程密切相关<sup>[1]</sup>。miRNA 成员中的 miRNA-145 是一种癌细胞抑制基因,可调控多种目的基因<sup>[2]</sup>,通过抑制肿瘤细胞分裂、转移等而控制肿瘤的发展<sup>[3]</sup>。研究发现,在乳腺癌、前列腺癌等肿瘤中 miRNA-145 呈低表达<sup>[4]</sup>。本文对采用定量聚合酶链反应 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 检测卵巢癌中 miRNA-145 表达,并且探讨其对卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

细胞株:人卵巢癌细胞株 SKOV-3 购自中国科学院上海细胞所,常规细胞培养、传代。

组织样本:56 例卵巢癌组织和卵巢癌旁正常组织及 48 例正常卵巢组织均来自本院病理科,各样本提取后立刻置于-80℃液氮中保存。56 例卵巢癌患者年龄 34~68 岁,中位年龄 48 岁;国际妇产科联合会分期 I 期 7 例、II 期 11 例、III 期 23 例、IV 期 15 例;高分化 8 例、中分化 17 例、低分化 31 例。48 例正常卵巢组织来自因子宫肌瘤子宫切除术患者,年龄 37~71 岁,中位年龄 51 岁。

主要试剂:DMEM 培养基、胎牛血清、Lipofectamine 购自美国 Invitrogen Gibco 公司;miRNA-145-mimic 购自上海吉玛制药技术有限公司;四甲基偶氮唑盐 (MTT)、胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司,Trizol 试剂、逆转录试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。miRNA-145 及内参 U6 引物设计与合成由天根生化科技(北京)有限公司完成,引物序列见 Table 1。

Table 1 Primer Sequence

Primer	Sequence
miRNA-145	Forward: 5'- CAGTGCCTGTCGTGGAGT -3'
	Reverse: 5'- AGGTCCAGTTTTCCCAGG -3'
U6	Forward: 5'- CTCGCTTCGGCAGCACA -3'
	Reverse: 5'- AACGCTTCACGAATTTGCGT -3'

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 卵巢组织 miRNA-145 表达水平的测定

将保存于-80℃冰箱中的卵巢癌组织、卵巢癌旁

正常组织或正常卵巢组织各 50mg 用 4℃预冷的磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗,然后置于 Cryomill 全自动冷冻研磨仪,加入液氮维持低温,研碎组织成为微细颗粒状(约 5μm),使用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒 RNA,采用 EXL808 全自动酶标仪测定 260nm 和 280nm 的吸光度(A)值,控制 A260/A280 在 1.9~2.1, RNA 电泳检测其完整性。检测浓度及纯度后采用逆转录试剂盒合成第一链 cDNA,将逆转录所得 cDNA 纯化后进行 qPCR 扩增。取 2μg 总 RNA,根据逆转录试剂盒说明书,以总 RNA 为模板进行逆转录反应得 cDNA。逆转录条件:16℃ 30min;42℃ 30min;85℃ 5min。将逆转录所得 cDNA 纯化后进行 PCR 扩增。反应总体积为 20μl:1.5μl cDNA 模板,1μl miR-145 或 U6 引物,10μl miRNA qPCR Mix,7.5μl H<sub>2</sub>O。PCR 反应条件:94℃预变性 3min,然后以 94℃ 20s、60℃ 20s 和 72℃ 40s,40 个循环。以 U6 为参照,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算 miRNA-145 的相对表达量。

#### 1.2.2 卵巢癌细胞株 SKOV-3 培养

从液氮中取出冻存的卵巢癌细胞 SKOV-3 迅速复苏后转入培养瓶,用含 10%(V/V)胎牛血清的 DMEM 培养基在 CO<sub>2</sub> 培养箱于 5%CO<sub>2</sub>、37℃条件下培养,每 48h 更换 1 次培养基,当细胞长满 90%时进行消化、传代,取第 3 代细胞用于实验。

#### 1.2.3 卵巢癌细胞株 SKOV-3 miRNA-145 表达测定

取卵巢癌细胞 SKOV-3,以 5×10<sup>5</sup> 密度接种于培养板,将细胞随机分为正常对照组、空白病毒组和病毒转染组。病毒转染组细胞加入 miRNA-145-mimic (1.0μg/ml),空白病毒组加入等体积空白病毒质粒,正常对照组加入等体积生理盐水,培养 6h,更换为含 10%(V/V)胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、37℃条件下继续培养至 24h,收获各组细胞。用 Trizol 液提取 RNA,采用 EXL808 全自动酶标仪测定 450nm 的吸光度 OD 值,控制 A260/A280 在 1.9~2.1, RNA 电泳检测其完整性。检测浓度及纯度后采用逆转录试剂盒合成第一链 cDNA,将逆转录所得 cDNA 纯化后进行 PCR 扩增。PCR 过程具体见 1.2.1。

#### 1.2.4 卵巢癌细胞株 SKOV-3 增殖实验

取卵巢癌细胞 SKOV-3,以 5×10<sup>5</sup> 的密度接种于 96 孔培养板,将细胞随机分为正常对照组、空白病毒组和病毒转染组。病毒转染组细胞加入 miRNA-

145-mimic (1.0 $\mu$ g/ml), 空白病毒组加入等体积空白病毒质粒, 正常对照组加入等体积生理盐水, 培养 6h, 更换为含 10%(V/V)胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C 条件下继续培养至 20h、44h 和 68h。每孔加入 5mg/ml MTT 溶液 20 $\mu$ l, 继续培养 4h 后弃上清液, 加 DMSO 150 $\mu$ l/孔, 振荡溶解 15min, 立即用酶标仪测定在 450nm 波长处的 OD 值, 各组细胞的增殖活力用 OD 值衡量。

### 1.2.5 卵巢癌细胞株 SKOV-3 迁移实验

取卵巢癌细胞 SKOV-3, 以 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/孔培养至细胞铺满单层, 用 20 $\mu$ l 移液枪头沿培养板底部垂直划线, 用 PBS 冲洗 3 次。将细胞随机分为正常对照组、空白病毒组和病毒转染组。病毒转染组细胞加入 miRNA-145-mimic (1.0 $\mu$ g/ml), 空白病毒组加入等体积空白病毒质粒, 正常对照组加入等体积生理盐水, 培养 6h, 更换为含 10%(V/V)胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C 条件下继续培养至 24h 拍照, 测量间距。各组设 6 个复孔。

### 1.2.6 卵巢癌细胞株 SKOV-3 细胞侵袭实验

取卵巢癌细胞 SKOV-3, 以 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 密度接种于培养板, 将细胞随机分为正常对照组、空白病毒组和病毒转染组。病毒转染组细胞加入 miRNA-145-mimic (1.0 $\mu$ g/ml), 空白病毒组加入等体积空白病毒质粒, 正常对照组加入等体积生理盐水, 培养 6h, 更换为含 10%(V/V)胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C 条件下继续培养至 24h, 收获各组细胞。制备 Transwell 小室(上室), 加入 100 $\mu$ l 密度为 10<sup>5</sup> 个/ml 对数生长期的各组细胞, 将上室放入细胞培养板孔(下室)。下室加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基。培养 24h 后取出上室, 用棉签将上室内细胞刮除, 用多聚甲醛固定, 染色, 双蒸水冲洗上室, 在相差显微镜下进行细胞计数。各组设 6 个复孔。

### 1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。测量结果以平均值 $\pm$ 标准差表示, 组间分析采用单因素方差 LSD-t 检验分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同卵巢组织 miRNA-145 水平比较

卵巢癌组织、卵巢癌旁组织和正常卵巢组 miR-

NA-145 表达水平分别为 0.56 $\pm$ 0.23、2.33 $\pm$ 0.29 和 2.37 $\pm$ 0.28。卵巢癌组织 miRNA-145 表达水平较卵巢癌旁组织和正常卵巢组织显著性降低( $t=36.190$ ,  $P<0.001$ ;  $t=35.786$ ,  $P<0.001$ )。卵巢癌旁组织和正常卵巢组织中 miRNA-145 差异均无统计学意义 ( $t=0.712$ ,  $P=0.056$ )(Figure 1)。

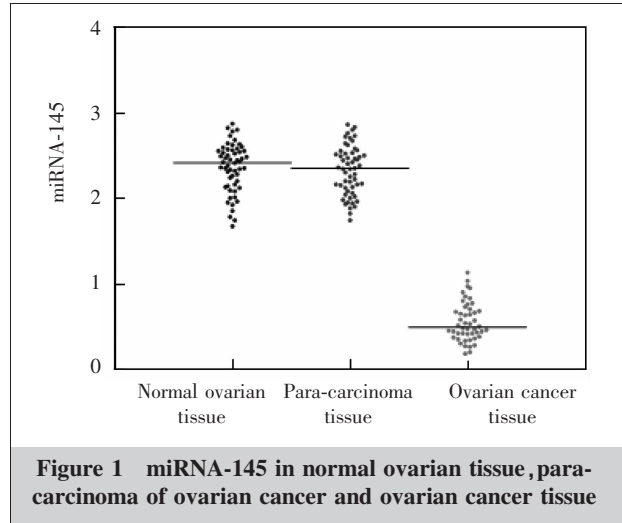


Figure 1 miRNA-145 in normal ovarian tissue, para-carcinoma of ovarian cancer and ovarian cancer tissue

### 2.2 卵巢癌组织 miRNA-145 表达和临床参数相关性

卵巢癌组织 miRNA-145 表达水平与国际妇产科联合会分期和组织分化程度相关( $P<0.05$ ), 但与年龄无关( $P>0.05$ )(Table 2)。

### 2.3 不同组卵巢癌细胞株 SKOV-3 miRNA-145 表达比较

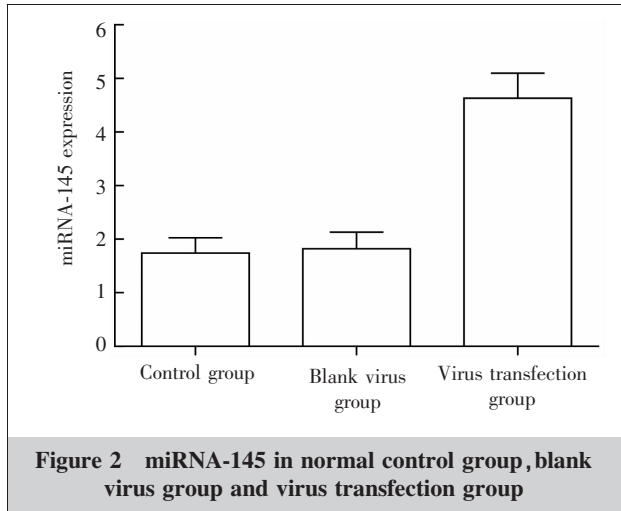
病毒转染组细胞的 miRNA-145 表达水平较正常对照组和空白病毒对照组显著性增加( $t=12.818$ ,  $P<0.001$ )。正常对照组和空白病毒对照组细胞的 miRNA-145 表达水平差异均无统计学意义( $t=12.225$ ,

Table 2 Relationship of miRNA-145 in ovarian cancer tissue and clinical parameters

Features	N	miRNA-145	t/F	P
Age(years old)				
<65	38	0.53 $\pm$ 0.24	1.240	0.232
$\geq$ 65	18	0.61 $\pm$ 0.19		
FIGO stage				
I	7	1.48 $\pm$ 0.21	143.779	<0.001
II	11	0.93 $\pm$ 0.18		
III	23	0.37 $\pm$ 0.15		
IV	15	0.16 $\pm$ 0.12		
Differentiation degree				
High differentiation	8	1.39 $\pm$ 0.23	178.441	<0.001
Middle differentiation	17	0.76 $\pm$ 0.17		
Low differentiation	31	0.23 $\pm$ 0.14		

$P < 0.001$ ) (Figure 2)。

**2.4 不同组卵巢癌细胞株 SKOV-3 的增殖实验结果**  
病毒转染组细胞在培养 24h、48h 和 72h 时 OD



**Figure 2 miRNA-145 in normal control group, blank virus group and virus transfection group**

**Table 3 Proliferation of ovarian carcinoma cell SKOV-3 in different group**

Group	0h	24h	48h	72h
Control group	0.47±0.11	1.14±0.21	1.74±0.28	2.47±0.31
Blank virus group	0.51±0.13	1.06±0.19	1.69±0.25	2.41±0.28
Virus transfection group	0.49±0.12	0.68±0.15	1.17±0.23	1.62±0.26

值均较正常对照组和空白病毒对照组显著性降低 ( $P < 0.05$ )。正常对照组和空白病毒对照组细胞在培养 24h、48h 和 72h 时 OD 值差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (Table 3)。

**2.5 不同组卵巢癌细胞株 SKOV-3 细胞迁移情况**

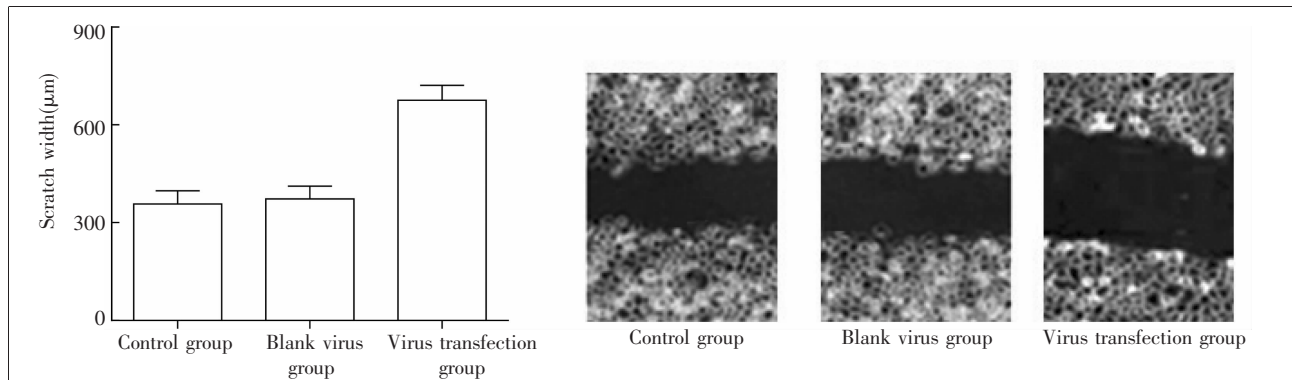
病毒转染组细胞的划痕宽度较正常对照组和空白病毒对照组显著性增大 ( $t = 12.641, P < 0.001$ )。正常对照组和空白病毒对照组细胞的划痕宽度差异均无统计学意义 ( $t = 12.266, P < 0.001$ ) (Figure 3)。

**2.6 不同组卵巢癌细胞株 SKOV-3 细胞侵袭情况**

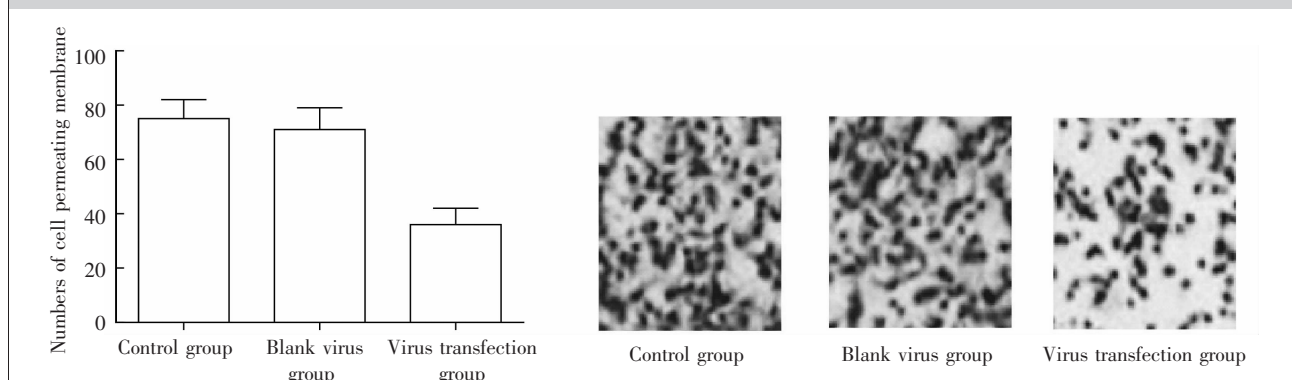
病毒转染组穿膜细胞数量较正常对照组和空白病毒对照组显著性降低 ( $t = 10.362, P < 0.001$ )。正常对照组和空白病毒对照组穿膜细胞数量差异均无统计学意义 ( $t = 8.573, P < 0.001$ ) (Figure 4)。

**3 讨论**

卵巢癌是女性生殖系统中常见的恶性肿瘤<sup>[5]</sup>。约 75% 患者是在晚期及转移遍布腹膜、胸膜或肝脏后才被



**Figure 3 Cell migration in control group, blank virus group and virus transfection group**



**Figure 4 Cell invasion in control group, blank virus group and virus transfection group**

确诊<sup>[6]</sup>。

miRNA 由 20~24 个核苷酸短序列组成,长度约为 19~25nt,本身十分保守,无开放阅读框架。大部分 miRNAs 通过抑制靶基因切割或者翻译而广泛参与与基因的表达调控,在多种癌症的发生发展中起着重要的作用<sup>[7]</sup>。miRNA-145 位于人类 5 号染色体,长度约 4.08kb,不编码蛋白质,不包含开放阅读框架。miRNA-145 是一种抑癌基因,多种肿瘤中呈低表达。miRNA-145 可抑制 C-Myc 和 IRS-1 表达而抑制肿瘤细胞生长,通过下调 ADAM17、Mucin-1、FSCN-1 表达来抑制细胞转移和侵袭<sup>[8]</sup>。因此,miR-145 在肿瘤的发生进展过程中通过多种不同途径抑制细胞增殖<sup>[9]</sup>。已有研究显示 miR-145 在卵巢浆液性癌中的表达亦显著性下降<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,卵巢癌组织 miRNA-145 较卵巢癌旁组织和正常卵巢组织降低 ( $P < 0.05$ ),说明卵巢癌组织中 miR-145 表达下降,与文献报道结果一致。miRNA-145 表达水平与患者临床参数相关性结果显示,与患者国际妇产科联合会分期和组织分化程度相关,随着临床分期的增加以及组织分化程度降低,miRNA-145 表达水平降低,但是卵巢癌组织 miRNA-145 的表达水平与年龄无关。进一步体外研究显示,卵巢癌细胞 SKOV-3 经 miRNA-145-mimic 作用后 miRNA-145 表达显著性增加 ( $P < 0.05$ ),并且病毒转染组细胞在培养 24h、48h 和 72h 的 OD 值均较正常对照组和空白病毒对照组显著性降低 ( $P < 0.05$ ),说明卵巢癌细胞 SKOV-3 miRNA-145 表达增加则其增殖受到抑制。

侵袭是肿瘤细胞降解细胞外基质向局部邻近组织的浸润,而迁移是肿瘤细胞突破血管膜或淋巴管膜并在其他器官生长。侵袭和迁移与肿瘤细胞侵袭性增强、黏附能力下降有关,此外与肿瘤血管生成、细胞外基质降解以及间质重构等密切相关<sup>[11]</sup>。在本研究中,病毒转染组卵巢癌细胞 SKOV-3 的划痕宽度较正常对照组和空白病毒对照组增大 ( $P < 0.05$ ),病毒转染组穿膜细胞数量较正常对照组和空白病毒对照组降低 ( $P < 0.05$ ),说明病毒转染组卵巢癌细胞 SKOV-3 转移和侵袭能力降低。增加卵巢癌细胞 SKOV-3 miRNA-145 可以抑制其转移和侵袭能力。

总之,miRNA-145 低表达可能与卵巢癌的发生发展有关,过表达 miRNA-145 能够抑制卵巢癌细胞株的增殖、迁移和侵袭,miRNA-145 可以作为治疗

卵巢癌的新作用靶点。

## 参考文献:

- [1] Lee E, Ito K, Zhao Y, et al. Inferred miRNA activity identifies miRNA-mediated regulatory networks underlying multiple cancers[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(1):96-105.
- [2] Messina CS, Weiher H, Schmidt-Wolf IG. Targeting prostate cancer with a combination of WNT inhibitors and a bi-functional peptide[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(2): 555-559.
- [3] Kim TH, Jeon HG, Jeong BC, et al. Development of a new nomogram to predict insignificant prostate cancer in patients undergoing radical prostatectomy[J]. *Scand J Urol*, 2017, 51(1):27-32.
- [4] Xing XF, Li ZY. Expression of miR-143 and miR-145 and their functional study in gastric carcinoma[J]. *Chin J Gastrointest Surg*, 2015, 18(1):50-53. [邢晓芳, 李子禹. miR-143 和 miR-145 在胃癌中的表达及功能研究[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2015, 18(1):50-53.]
- [5] Song XX, Yao L, Zhang ZX, et al. Effect of small interfering RNA silencing PGRMC1 gene on proliferation of ovarian carcinoma in vitro and in vivo[J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2017, 23(6):508-512. [宋晓霞, 姚丽, 张占薪, 等. PGRMC1 基因小分子干扰 RNA 对卵巢癌细胞体外增殖的影响[J]. *肿瘤学杂志*, 2017, 23(6):508-512.]
- [6] Baldein LA, Hhang B, Miller RW, et al. Ten-year relative survival for epithelial ovarian cancer[J]. *Obstet Gynecol*, 2012, 120(3):612-618.
- [7] Babashah S, Soleimani M. The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis[J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(8):1127-1137.
- [8] Lu Y, Chopp M, Zhang X, et al. miR-145 reduces ADAM17 expression and inhibits in vitro migration and invasion of glioma cells[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(1):67-72.
- [9] Cho WCS, Chow ASC, Au JSK. MiR-145 inhibits cell proliferation of human lung adeno-carcinoma by targeting EGFR and NUDT1[J]. *RNA Biology*, 2011, 8(1):125-131.
- [10] Chung YW, Bae HS, Song JY, et al. Detection of microRNA as novel biomarkers of epithelial ovarian cancer from the serum of ovarian cancer patients[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2013, 23(4):673-679.
- [11] Yio X, Diamon DM, Zhang JY, et al. Trefoil factor family-1 mutations enhance gastric cancer cell invasion through distinct signaling pathways[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(6):1696-1706.