

卵巢癌细胞多药耐药中 miR-193a-3p 的表达及作用

孙正伟¹, 马蓉², 徐福霞¹, 徐汉杰³, 赵卫东³

[1. 安徽省第二人民医院妇产科, 合肥 230041; 2. 安徽省妇幼保健院妇产科; 3. 中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)妇产科]

[摘要] **目的** 探讨在卵巢癌细胞多药耐药中 miR-193a-3p 的表达及其作用。**方法** 采用 MTT 法分析卵巢癌细胞系 A2780、SKOV-3、HO8910 和 ES-2 对 5 种化疗药物的敏感性, 确定其半数抑制浓度(IC₅₀)值; 用定量实时 PCR(qRT-PCR)方法检测 miR-193a-3p; 转染 miR-193a-3p mimic 于最低表达 miR-193a-3p 的相对多药最敏感的卵巢癌细胞系 ES-2 中, 用 qRT-PCR 方法检测转染效率; 用 MTT 方法在转染后相对多药最敏感的卵巢癌细胞系 ES-2 中检测其对上述化疗药物敏感性的差异。**结果** 在相对多药最敏感的卵巢癌细胞系 ES-2 中 miR-193a-3p 的表达最低, 而在相对多药最耐药的卵巢癌细胞系 SKOV-3 中 miR-193a-3p 的表达最高($P < 0.01$); 转染 miR-193a-3p mimic 于相对多药最敏感的卵巢癌细胞系 ES-2 中后, 使其增加对(紫杉醇, 卡铂, 多西他赛)化疗药物的耐受性($P < 0.01$)。**结论** 卵巢癌细胞多药耐药的调控中可能有 miR-193a-3p 的参与。

[关键词] 卵巢肿瘤; 多药耐药相关蛋白类; 调控序列, 核糖核酸; 敏感性与特异性

DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2020.03.026

The expression and role of miR-193a-3p in multidrug resistance of ovarian cancer cells Sun Zhengwei*, Ma Rong, Xu Fuxia, Xu Hanjie, Zhao Weidong (* Department of Gynecology and Obstetrics, Anhui No. 2 Provincial People's Hospital, Hefei 230041, China)

Corresponding author: Zhao Weidong, Email: victorzhao@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and role of miR-193a-3p in multidrug resistance of ovarian cancer cells. **Methods** MTT method was used to analyse of ovarian cancer cell line A2780, SKOV-3, HO8910, ES-2 to sensitivity of 5 chemotherapeutic drugs, and the value of half maximal inhibitory concentration (IC₅₀). The quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-193a-3p in ovarian cancer cell lines ES-2. MiR-193a-3p mimic was transfected into ES-2, the most multidrug-sensitive ovarian cancer cell line with the lowest expression of miR-193a-3p, and the transfection efficiency was detected by qRT-PCR; Differences in sensitivity to chemotherapeutic drugs were detected by MTT assay in ES-2, the most multidrug-sensitive ovarian cancer cell line after transfection. **Results** The miR-193a-3p expression was the lowest in the ovarian cancer cell line ES-2, which was the most sensitive to multiple drugs, and the highest in SKOV-3, which was the most resistant to multiple drugs ($P < 0.01$). The resistance of the most multidrug-sensitive ovarian cancer cell line (ES-2), to chemotherapeutic drugs (Paclitaxel, Carboplatin, Docetaxel) was increased by transfection with miR-193a-3p mimic ($P < 0.01$). **Conclusion** MiR-193a-3p may be involved in the regulation of multidrug resistance in ovarian cancer cells.

[Keywords] Ovarian neoplasms; Multidrug resistance-associated proteins; Regulatory sequences, ribonucleic acid; Sensitivity and specificity

妇科癌症中死亡的主要原因之一是卵巢癌。大多数病例是隐匿发病, 且没有准确有效的早期诊断方法。确诊后, 70% 至 80% 的患者已为晚期。目前, 临床上治疗卵巢癌的标准方法是肿瘤细胞减灭

术和基于铂类和紫杉醇的术后联合化疗。但是, 由于肿瘤细胞存在多重耐药性, 卵巢癌 5 年生存率仅仅只达 30%^[1]。多药耐药性已成为有效治疗卵巢癌的主要障碍。为了改善卵巢癌的预后, 对多药耐

基金项目: 安徽省科技厅资助项目(1604f0804010)

作者简介: 孙正伟, 住院医师, Email: 380184026@qq.com

通信作者: 赵卫东, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, Email: victorzhao@163.com

药机制的研究已成为关键。近年来,涉及调节肿瘤细胞对化学疗法耐受性的微小 RNA (microRNAs) 的研究成为热门话题。对于卵巢癌,如 miR-20a^[2], miR-137^[3], miR-205^[4] 和 miR-519a^[5] 等已报道与化疗耐药有关。最近的研究^[6] 表明 miR-193a-3p 参与 CD44⁺ 胃癌细胞中顺铂耐受性的调节。还未见关于 miR-193a-3p 是否参与卵巢癌多药耐药性机制的研究报道。这项研究通过 MTT 分析筛选出多药敏感卵巢癌细胞系及多药耐药卵巢癌细胞系。qRT-PCR 检测 miR-193a-3p 在上述两种卵巢癌细胞系中的表达,探讨 miR-193a-3p 与卵巢癌细胞多药耐药的关系及其作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人卵巢癌细胞系 HO8910, ES-2 和 SKOV-3 来源于中国科学院上海细胞研究所; A2780 细胞系来自北京协和医院肿瘤细胞库。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清 (FBS, 美国 Invitrogen 公司生产), McCoy's 5A, RPMI Medium-1640, DMEM (美国 Gibco 公司生产); MTT (美国 Sigma 公司生产); 紫杉醇 (Pa, 哈尔滨药业集团生产), 顺铂 (Ci, 江苏豪森制药有限公司生产), 卡铂 (Kp, 齐鲁制药有限公司生产), 多西紫杉醇 (Dt, 江苏恒瑞制药有限公司生产) 和依托泊苷 (It, 江苏恒瑞医药股份有限公司生产); miR-193a-3p mimic, miR-193a-3p 引物, the scramble sequence (NC, negative control) 和转染试剂 ribo FECTTM CP 转染试剂盒购于广州瑞博生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用包含 10% FBS 的 McCoy's 5A 培养基培养人卵巢癌细胞系 SKOV-3 和 ES-2, 使用包含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养细胞系 HO8910, 并用 RPMI Medium-1640 培养细胞系 A2780, 均培养在 5% 二氧化碳 (CO₂), 37 °C 的培养箱中。

1.2.2 MTT 法检测四种卵巢癌细胞对五种化疗药的 IC₅₀ 值 对数生长期的卵巢癌细胞系经胰酶消化并接种在 96 孔板中。经 24 h 细胞贴壁, 将五种化疗药 (顺铂, 紫杉醇, 多西紫杉醇, 卡铂和依托泊苷) 添加到五种梯度浓度中的每一种中。经 72 h 孵育后, 向每个孔中添加 20 μL (5 mg/mL) MTT 试剂, 并继续在孵育箱中孵育 4 h。除去培养基, 向每个孔中加入 150 μL DMSO 以溶解甲瓖, 然后轻轻摇动振荡器 10 min 以完全溶解甲瓖。酶标仪使用波长 570

nm 来测量吸光度 (OD) 值。通过 Msvbvm50 软件计算与每种细胞的 50% 抑制率相对应的药物及浓度。重复实验 3 遍。

1.2.3 定量实时 PCR (qRT-PCR) 法检测 miR-193a-3p 表达 用 Trizol 法从卵巢癌细胞中提取 5 μg 的总 RNA 与 10 nm dNTPS 1 μL 和 100 nm Oligo-dT 1 μL 混合。在 65 °C 下加热 5 min 后, 立即将其置于冰上 2 分钟。加入反转录混合物 (5 X RT 缓冲液 4 μL, 0.1 mm DTT 2 μL, Rnase 抑制剂, 反转录酶 50 u), 在 42 °C 反应 50 min 以合成 cDNA。通过在 70 °C 下加热 10 min 来终止反应, 并在 -20 °C 下保存。使用 SYBR Green 方法在定量实时 PCR 仪器 (FTC-3000P, 加拿大丰凌生物技术有限公司) 中检测 miR-193a-3p 的表达水平。

1.2.4 miR-193a-3p mimic 的瞬时转染 在转染前, 将卵巢癌细胞接种并在 6 孔板中培养, 以达到 30% 至 50% 的细胞密度。对每个孔的转染样品制备: 用 120 μL 1 X Ribo FECTTM CP Buffer 稀释 20 μM miR-193a-3p NC/ mimic 5 μL。轻轻摇匀, 加入 Ribo FECTTM CP 试剂 12 μL, 吹打轻轻混匀, 然后在室温下孵育 15 min。将上述混合液体添加到 1863 μL 细胞培养基中并轻轻混合。将培养板放置在 37 °C 的 CO₂ 培养箱中 24 h, 用于从细胞中提取总 RNA 并接种 96 孔板, 用于化疗药物对卵巢癌细胞的 MTT 实验。重复实验 3 遍。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计, α = 0.01 为检验水准。ES-2 (相对多药最敏感的卵巢癌细胞系) 和 SKOV-3 (相对多药最耐药的卵巢癌细胞系) 之间的 miR-193a-3p 表达差异及在 ES-2 细胞中转染 NC 和 miR-193a-3p mimic 后的 miR-193a-3p 表达差异以及 ES-2 细胞对四种化疗药 (紫杉醇, 卡铂, 多西紫杉醇和依托泊苷) 中每种药物耐受性的变化差异, 均应用 *t* 检验。

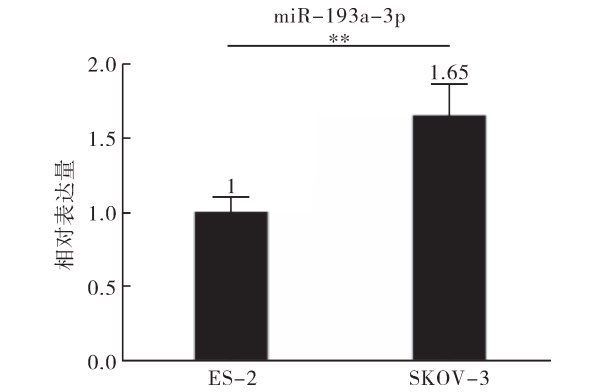
2 结果

2.1 MTT 法检测五种化疗药对细胞系 HO8910, ES-2, A2780, SKOV-3 的 IC₅₀ 值 用 MTT 法测定五种化疗药 (紫杉醇、卡铂、顺铂、多西紫杉醇和依托泊苷) 对四种卵巢癌细胞系 (HO8910、ES-2、A2780、SKOV-3) 的 IC₅₀ 值。在排除顺铂后, 从剩余的四种化疗药中筛选出 ES-2 (相对多药最敏感的卵巢癌细胞系) 和 SKOV-3 (相对多药最耐药的卵巢癌细胞系)。两种卵巢癌细胞系的具体值见表 1。

表 1 五种化疗药对 ES-2 及 SKOV-3 的 IC₅₀ 值

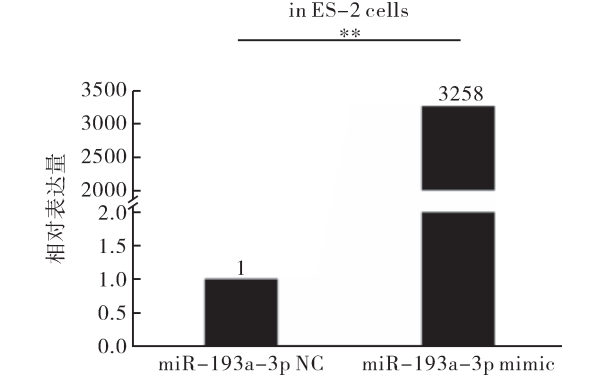
化疗药物	ES-2 IC ₅₀ (μg/mL)	SKOV-3 IC ₅₀ (μg/mL)	ES-2/SKOV-3 (倍数)
紫杉醇	0.03	9.70	0.003:1
卡铂	19.80	31.75	0.62:1
顺铂	5.28	0.83	6.36:1
多西紫杉醇	4.40	11.80	0.37:1
依托泊苷	2.85	8.26	0.35:1

2.2 miR-193a-3p 在 ES-2(相对多药最敏感的卵巢癌细胞系)及 SKOV-3(相对多药最耐药的卵巢癌细胞系)中的表达 结果表明,其在卵巢癌细胞系 ES-2 中低表达,而在卵巢癌细胞系 SKOV-3 中高表达,差异有统计学意义($t=9.41, P<0.01$)。如图 1 所示。

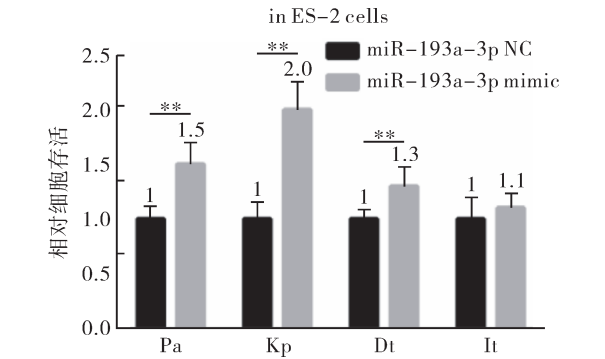


注:与 SKOV-3 比较, ** $P<0.01$
图 1 qRT-PCR 方法检测 miR-193a-3p 在 ES-2(相对多药最敏感的卵巢癌细胞系)及 SKOV-3(相对多药最耐药的卵巢癌细胞系)中的表达

2.3 miR-193a-3p mimic 可提高 ES-2(相对多药最敏感的卵巢癌细胞系)对三种化疗药的耐药性 与 NC 组相比,转染了 miR-193a-3p mimic 组中 miR-193a-3p 表达显著升高($t=57.73, P<0.01$),如图 2 所示。在转染 NC 和 miR-193a-3p mimic 后,通过 MTT 方法检测 ES-2(相对多药最敏感的卵巢癌细胞系)对四种化疗药(紫杉醇、卡铂、多西紫杉醇及依托泊苷)的敏感性。结果表明,与 NC 组相比,转染了 miR-193a-3p mimic 组中,ES-2(相对多药最敏感的卵巢癌细胞系)对三种化疗药(紫杉醇、卡铂、多西紫杉醇)的耐药性显著提高(除依托泊苷外),差异有统计学意义($t=6.05, P<0.01; t=4.23, P<0.01; t=9.19, P<0.01$),如图 3 所示。



注:与转染 NC 组比较, ** $P<0.01$
图 2 qRT-PCR 方法检测 ES-2(相对多药最敏感的卵巢癌细胞系)转染 NC 及 miR-193a-3p mimic 后 miR-193a-3p 的表达



注:Pa 为紫杉醇,Kp 为卡铂,Dt 为多西紫杉醇,It 为依托泊苷; mimic 组与 NC 组比较, ** $P<0.01$
图 3 MTT 方法检测在 ES-2(相对多药最敏感的卵巢癌细胞系)中转染 NC 和 miR-193a-3p mimic 后对四种化疗药的敏感性

3 讨论

目前,有效治疗卵巢癌的主要障碍为化疗耐药,特别是多药耐药^[7-8]。近年来,对卵巢癌化疗耐药机制的研究成为一个热门话题^[9]。例如, MicroRNAs(miRNAs)是一组非编码的小 RNA,它们在转录后水平上调节蛋白质编码基因的表达,并参与肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭、转移和代谢以及多药耐药等^[10]。而有关 miR-193a-3p 的研究团队表明,miR-193a-3p 可以通过在体内外抑制 SRSF2,PLAU,LOXL4,HIC2,HoxC9,ING5 和 PSEN1 的表达来调节 NF- κ B,DNA 损伤,Oxidative stress,Notch 和 Myc/max 五个信号通路,提高了膀胱癌对多种化疗药的耐药性^[11-12],并初步证实 miR-193a-3p 的表达同 4 种化疗药(吡柔比星,阿霉素,羟基喜树碱和盐酸表柔比星)的耐药性密切相关,而最近有研究^[6]报道,miR-193a-3p 参与 CD44⁺ 胃癌细胞对顺铂的耐药机制调节。目前为止,有关 miR-193a-3p 在卵巢癌化

疗耐药中的机制研究较少。

在这项研究选择了四种卵巢癌细胞系(HO8910、ES-2、A2780、SKOV-3)作为研究对象,并依据最新的NCCN指南从第一线化疗药中选择了顺铂、卡铂和紫杉醇。并从第二线化疗药中选择了依托泊苷和多西紫杉醇。用MTT法测定5种化疗药(紫杉醇、卡铂、顺铂、多西紫杉醇和依托泊苷)对4种卵巢癌细胞系(HO8910、ES-2、A2780、SKOV-3)的IC₅₀值。在排除顺铂后,从剩余的四种化疗药中筛选出ES-2(相对多药最敏感的卵巢癌细胞系)和SKOV-3(相对多药最耐药的卵巢癌细胞系)。用qRT-PCR检测miR-193a-3p在ES-2(相对多药最敏感的卵巢癌细胞系)及SKOV-3(相对多药最耐药的卵巢癌细胞系)中的表达。结果表明,miR-193a-3p在卵巢癌细胞系ES-2中低表达,而在卵巢癌细胞系SKOV-3中高表达。于是,将NC和miR-193a-3p mimic转染到ES-2(相对多药最敏感的卵巢癌细胞系)中,并使用qRT-PCR检测转染效率,与NC组相对比,转染了miR-193a-3p mimic组中miR-193a-3p表达相对增加约3 258倍。进而,在转染NC和miR-193a-3p mimic后,通过MTT方法检测ES-2(相对多药最敏感的卵巢癌细胞系)对4种化疗药(紫杉醇、卡铂、多西紫杉醇及依托泊苷)的敏感性,与NC组相对比,转染了miR-193a-3p mimic组中,ES-2(相对多药最敏感的卵巢癌细胞系)对3种化疗药(紫杉醇、卡铂、多西紫杉醇)的耐药性显著提高(除依托泊苷外)。这与关于胃癌^[6]、肝细胞肝癌^[13]和膀胱癌^[11-12]的文献中的报道结果相似。未来的研究重点在于:进一步探究miR-193a-3p是通过作用哪些下游的蛋白编码基因来参与卵巢癌的多药耐药机制的调节。

综上所述,miR-193a-3p mimic可以增加ES-2(相对多药最敏感的卵巢癌细胞系)对卡铂、紫杉醇和多西紫杉醇的耐药性。这可能为判断卵巢癌患者的预后提供新的分子标志物,并选择敏感的化疗药,可能为将来对卵巢癌的多药耐药性或基因靶向治疗的基础或临床研究提供新思路。

参考文献

- [1] ORR B, EDWARDS R P. Diagnosis and treatment of ovarian cancer[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2018, 32(6): 943-964.
- [2] LIU Y, HAN S, LI Y, et al. MicroRNA-20a contributes to

cisplatin-resistance and migration of OVCAR3 ovarian cancer cell line[J]. Oncol Lett, 2017, 14(2): 1780-1786.

- [3] LI X, CHEN W, ZENG W, et al. MicroRNA-137 promotes apoptosis in ovarian cancer cells via the regulation of XI-AP[J]. Br J Cancer, 2017, 116(1): 66-76.
- [4] WEI J, ZHANG L H, LI J, et al. MicroRNA-205 promotes cell invasion by repressing TCF21 in human ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2017, 10(1): 33.
- [5] TIAN F, JIA L G, CHU Z P, et al. MicroRNA-519a inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of ovarian cancer cells through targeting signal transducer and activator of transcription 3[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(2): 1819-1824.
- [6] LEE S D, YU D, LEE D Y, et al. Upregulated microRNA-193a-3p is responsible for cisplatin resistance in CD44⁺ gastric cancer cells[J]. Cancer Sci, 2019, 110(2): 662-673.
- [7] MANSOORI B, MOHAMMADI A, DAVUDIAN S, et al. The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review[J]. Adv Pharm Bull, 2017, 7(3): 339-348.
- [8] LEDERMANN J A. First-line treatment of ovarian cancer: questions and controversies to address[J]. Ther Adv Med Oncol, 2018, 10: 1758835918768232. DOI: 10. 1177/1758835918768232. eCollection 2018.
- [9] BICKELL N A, EGOROVA N, PRASAD-HAYES M, et al. Secondary surgery versus chemotherapy for recurrent ovarian cancer[J]. Am J Clin Oncol, 2018, 41(5): 458-464.
- [10] WANG Y W, ZHANG W, MA R. Bioinformatic identification of chemoresistance-associated microRNAs in breast cancer based on microarray data[J]. Oncol Rep, 2018, 39(3): 1003-1010.
- [11] LV L, LI Y, DENG H, et al. MiR-193a-3p promotes the multi-chemoresistance of bladder cancer by targeting the HOXC9 gene[J]. Cancer Lett, 2015, 357(1): 105-113.
- [12] DENG H, LV L, LI Y, et al. The miR-193a-3p regulated PSEN1 gene suppresses the multi-chemoresistance of bladder cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(3): 520-528.
- [13] MA H, YUAN L, LI W, et al. The LncRNA H19/miR-193a-3p axis modifies the radio-resistance and chemotherapeutic tolerance of hepatocellular carcinoma cells by targeting PSEN1[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(10): 8325-8335.

(收稿日期:2020-01-19)