

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.06.010

miR-145 通过调控 MMP-2、MMP-9 的表达对卵巢癌细胞凋亡、增殖、迁移的影响^{*}

张月宁,康媛,姬超[△]

陕西省第二人民医院妇产科,陕西西安 710005

摘 要:目的 研究微小 RNA-145(miR-145)通过调控基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 的表达对卵巢癌细胞凋亡、增殖、迁移的影响。方法 将卵巢癌细胞株随机分为 3 组,其中对照组为单纯卵巢癌细胞株,不做其他处理,进行正常培养;miR-145 组为含 miR-145 质粒的慢病毒转染的卵巢癌细胞株;NC 组为含 NC 质粒的慢病毒转染的卵巢癌细胞株。检测 3 组卵巢癌细胞的凋亡、增殖、迁移情况。检测 3 组 MMP-2、MMP-9 蛋白和 mRNA 表达水平。结果 与对照组、NC 组比较,miR-145 组卵巢癌细胞凋亡率明显升高,卵巢癌细胞增殖数、迁移数明显下降,差异均有统计学意义($P<0.05$);对照组与 NC 组卵巢癌细胞凋亡率、增殖数、迁移数差异无统计学意义($P>0.05$)。miR-145 组 MMP-2、MMP-9 蛋白和 mRNA 表达水平均低于 NC 组、对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。对照组与 NC 组 MMP-2、MMP-9 蛋白和 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 miR-145 可抑制卵巢癌细胞的增殖、迁移,促进凋亡,其作用机制可能与 miR-145 能降低 MMP-2、MMP-9 的表达有关。

关键词:微小 RNA-145; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶-9; 卵巢癌

中图分类号:R737.31

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)06-0755-04

Effect of miR-145 on apoptosis,proliferation and migration of ovarian cancer cells by regulating the expression of MMP-2 and MMP-9^{*}

ZHANG Yuening ,KANG Yuan ,JI Chao[△]

Department of Gynaecology and Obstetrics ,Shaanxi Second People's Hospital ,Xi'an ,Shaanxi 710005 ,China

Abstract: Objective To study the effects of microRNA-145 (miR-145) on the apoptosis,proliferation and migration of ovarian cancer cells by regulating the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9. **Methods** The ovarian cancer cell lines were randomly divided into 3 groups,among which the control group was a simple ovarian cancer cell line,without other treatments,and was cultured normally. MiR-145 group was ovarian cancer cell line transfected by lentivirus containing miR-145 plasmid. NC group was ovarian cancer cell line transfected by lentivirus containing NC plasmid. The apoptosis,proliferation and migration of ovarian cancer cells in 3 groups were detected. The protein and mRNA expression levels of MMP-2,MMP-9 in 3 groups were detected. **Results** Compared with control group and NC group,the apoptosis rate of ovarian cancer cells significantly increased,and the number of proliferation and migration of ovarian cancer cells significantly decreased in miR-145 group,the differences were statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference on the apoptosis rate,proliferation number and migration number of ovarian cancer cells between control group and NC group ($P>0.05$). The expression levels of MMP-2,MMP-9 protein and mRNA in miR-145 group were lower than those in NC group and control group,the differences were statistically significant ($P<0.05$). There was no significant difference on the expression levels of MMP-2 and MMP-9 protein and mRNA between control group and NC group ($P>0.05$). **Conclusion** MiR-145 can inhibit the proliferation and migration of ovarian cancer cells,promote apoptosis,and its mechanism may be related to reducing the expression levels of MMP-2 and MMP-9.

Key words: microRNA-145; matrix metalloproteinase-2; matrix metalloproteinase-9; ovarian cancer

卵巢癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一^[1],早期症状不典型,难以及时诊断,多数患者确诊

* 基金项目:陕西省卫生和计划生育委员会科研项目(2014D82)。

作者简介:张月宁,女,副主任医师,主要从事妇科肿瘤、高危妊娠的临床研究。 [△] 通信作者,E-mail:16810167@qq.com。

本文引用格式:张月宁,康媛,姬超.miR-145 通过调控 MMP-2、MMP-9 的表达对卵巢癌细胞凋亡、增殖、迁移的影响[J]. 检验医学与临床,2021,18(6):755-758.

时已是中、晚期,治愈率非常低,是女性肿瘤死亡的主要原因,且近年来发病率有逐渐升高趋势^[2]。研究卵巢癌的发病机制,对临床治疗具有重要意义。研究显示,微小 RNA-145(miR-145)在多种肿瘤组织中表达水平降低^[3],其可作为一种抑癌基因参与调控肿瘤细胞的生长、增殖、转移等多个环节^[4-5]。基质金属蛋白酶(MMP)是一种锌离子依赖的蛋白水解酶,能够降解基底膜和细胞外基质,可广泛参与机体内肿瘤侵袭、转移,组织的发育、修复,以及炎症反应等病理、生理过程。MMP-2 及 MMP-9 是 MMP 家族中的重要成员,在肿瘤侵袭和转移中发挥着重要作用^[6]。本研究通过分析 miR-145 对卵巢癌细胞凋亡、增殖、迁移的影响,以及 miR-145 与 MMP-2、MMP-9 表达水平的关系,以期对卵巢癌的临床治疗提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 癌细胞株来源 将购于上海索尔生物科技有限公司的卵巢癌细胞株随机分为 3 组,其中对照组为单纯卵巢癌细胞株,不做其他处理,进行正常培养;miR-145 组则是含 miR-145 质粒的慢病毒转染的卵巢癌细胞株;NC 组为含 NC 质粒的慢病毒转染的卵巢癌细胞株。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将卵巢癌细胞株在含有胎牛血清的 DMEM 培育液中培养,孵箱培养条件为 37℃、5% CO₂。当卵巢癌细胞生长至 80%~90%时,采用胰蛋白酶消化卵巢癌细胞,800 r/min 离心 5 min,收集、重悬并培养细胞。

1.2.2 细胞转染 将卵巢癌细胞稀释至 2×10⁵/mL,平铺到 24 孔板中,待卵巢癌细胞生长至 70%~80%时进行转染。将稀释的卵巢癌细胞分别加入含有 10 倍稀释的 miR-145 慢病毒原液和 10 倍稀释的 NC 慢病毒原液培养皿中进行转染,48 h 后荧光显微镜下可见卵巢癌细胞发出绿色荧光,表示转染成功。

1.2.3 检测卵巢癌细胞凋亡情况 分别将 3 组卵巢癌细胞置于 6 孔板内,待卵巢癌细胞生长至 70%~80%时,使用 100 nmol/L 的培美曲塞刺激卵巢癌细胞 12 h,按 TUNEL 试剂盒说明书进行标记染色,随机选取视野,用高倍镜(×400)观察卵巢癌细胞的凋亡情况。

1.2.4 检测卵巢癌细胞增殖情况 取 3 组卵巢癌细胞,稀释为 1×10⁵/mL,培养 12 h。取培养好的卵巢癌细胞平铺到 16 孔板中,并再次进行培养。培养到一定数量后,加入 CCK-8 10 μL,常温放置 30 min,检测 450 nm 波长处的吸光度(A)值,用于反映卵巢癌细胞的增殖数。

1.2.5 检测卵巢癌细胞迁移情况 取 3 组卵巢癌细胞,稀释为 1×10⁵/mL,培养 12 h。准备 Transwell 小室,上室铺细胞外基质水凝胶,下室加入 500 μL 含 10%胎牛血清的培养基,静置 4 h,吸出液体,残留液体风干。取 200 μL 培养好的细胞接种在 Transwell 迁移室中。24 h 后取出细胞,乙醇固定,结晶紫溶液

染色,显微镜(×100)观察,每组选 5 个视野观察细胞并计数。

1.2.6 蛋白质印迹法(Western blot)检测卵巢癌细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平 取 3 组卵巢癌细胞,稀释为 1×10⁵/mL,制备 12%分离胶。将电泳装置放置聚胶 1 h,每孔分别加入标本悬液 50 μg。开始电泳时电压为 90 V,当溴酚蓝进入分离胶后以 120 V 电泳,当溴酚蓝到达分离胶底部时终止电泳。取出分离胶,将聚偏二氟乙烯(PVDF)膜用甲醇浸泡 5~10 s。在 15 min 内用转膜液浸泡 PVDF 膜,10 min 内移进转膜槽,加入转膜液,转膜槽进行冰浴,70 V、1.5 h。转膜完成时,从转膜槽内把 PVDF 膜取出,TBST 缓冲液洗 2 次,每次 10 min。将 PVDF 膜置于封闭液中,水平摇床密封 2 h。然后把 PVDF 膜装进有一抗的自制杂交袋内,4℃过夜。将 PVDF 膜取出,用 TBST 缓冲液清洗 3 次,每次 10 min。孵育后,将 PVDF 膜用 TBST 缓冲液洗 3 次,每次 10 min,冲洗完成后将 PVDF 膜放入对应的二抗中常温孵育 1.5 h,轻轻晃动。待孵育结束,用 TBST 缓冲液洗 3 次,每次 10 min,将 ECL 显色液 A 液和 B 液按 1:1 比例混合为工作液,加工作液至 PVDF 膜内,放置 1 min。PVDF 膜检测采用全自动化学发光成像分析系统。

1.2.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测卵巢癌细胞中 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达水平 在 3 组卵巢癌细胞株培养液中加入氯仿,振荡,离心,使溶液呈乳白色,4℃下 1 200 r/min 离心 5 min,加异丙醇、75%乙醇,1 200 r/min 离心 5 min,干燥,-80℃保存。反转录体系:94℃ 15 min,94℃ 15 s,60℃ 34 s,72℃ 10 min,40 个循环。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

项目	引物	长度(bp)
MMP-2	F:5'-TGATCTTGACCAGAATACCATCGA-3'	108
	R:5'-GGCTTGCAGGGAAGAAGTT-3'	98
MMP-9	F:5'-CCTGGAGACCTGAGAACCAATC-3'	102
	R:5'-CCACCGAGTGTAACCATAGC-3'	96
GAPDH	F:5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'	110
	R:5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'	94

注:F 为上游引物,R 为下游引物。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌细胞凋亡情况 NC 组、对照组、miR-145 组卵巢癌细胞凋亡率分别为 13.54%、13.73%、42.63%。与对照组、NC 组比较,miR-145 组卵巢癌细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);对照组与 NC 组卵巢癌细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

2.2 卵巢癌细胞增殖情况 miR-145 组卵巢癌细胞

增殖数最低(A 值为 0.08 ± 0.01),NC 组(A 值为 0.16 ± 0.03)、对照组(A 值为 0.15 ± 0.02)卵巢癌细胞增殖数明显高于 miR-145 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);对照组与 NC 组卵巢癌细胞增殖数差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 卵巢癌细胞迁移情况 NC 组、对照组、miR-145 组卵巢癌细胞迁移数分别为 (34.25 ± 3.42)、(35.17 ± 3.75)、(17.54 ± 1.64)个,NC 组、对照组卵巢癌细胞迁移数明显高于 miR-145 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组与 NC 组卵巢癌细胞迁移数差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

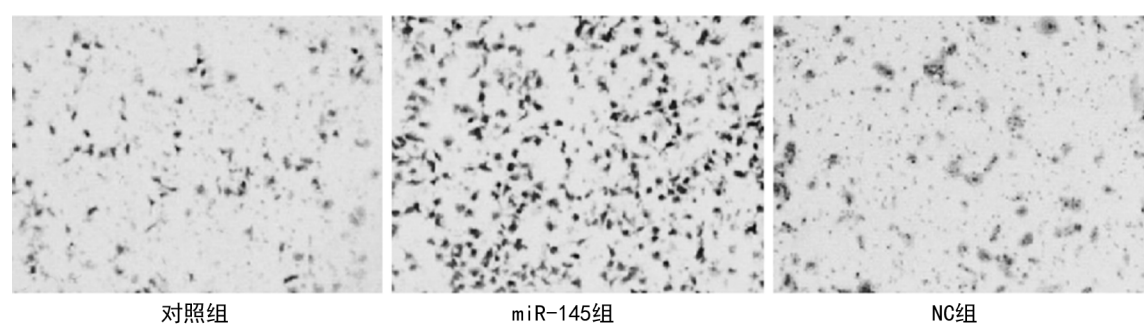


图 1 3 组卵巢癌细胞凋亡情况($\times 400$)

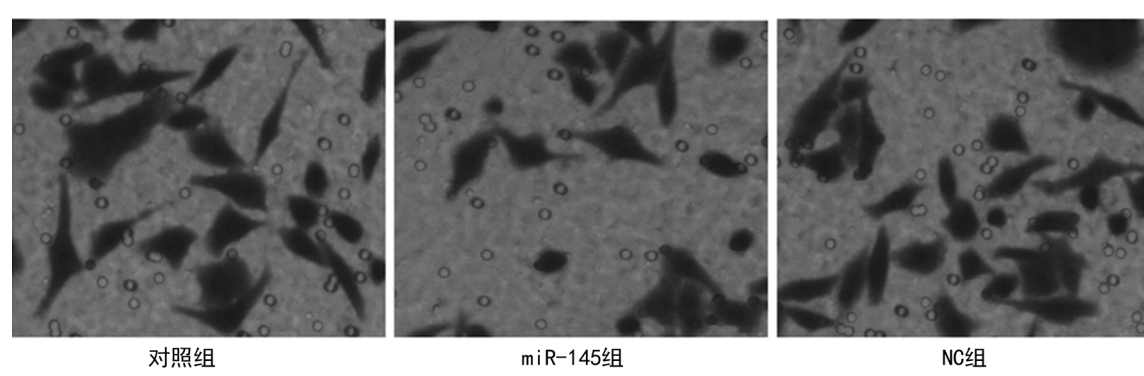


图 2 3 组卵巢癌细胞迁移情况($\times 100$)

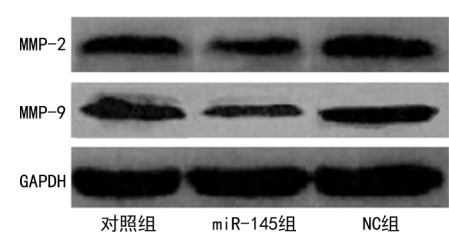
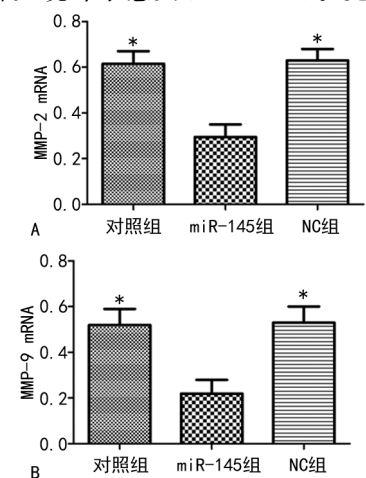


图 3 3 组卵巢癌细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的 Western blot 结果

2.5 卵巢癌细胞中 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达水平 qRT-PCR 检测结果显示,NC 组、miR-145 组和对照组的 MMP-2 mRNA 表达水平分别为 0.61 ± 0.22 、 0.26 ± 0.11 、 0.62 ± 0.24 ,3 组间比较,差异有统计学意义($F = 234.397$, $P < 0.05$);MMP-9 mRNA 表达水平分别为 0.51 ± 0.13 、 0.19 ± 0.08 、 0.50 ± 0.18 ,3 组间比较,差异有统计学意义($F = 165.835$, $P < 0.05$)。miR-145 组 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达水平低于 NC 组、对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组与 NC 组 MMP-2、MMP-9 mRNA 表

2.4 卵巢癌细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平 Western blot 结果显示,NC 组、miR-145 组和对照组 MMP-2 蛋白表达水平分别为 0.74 ± 0.12 、 0.39 ± 0.07 、 0.73 ± 0.14 ,3 组间比较,差异有统计学意义($F = 54.462$, $P < 0.05$);MMP-9 蛋白表达水平分别为 0.43 ± 0.11 、 0.26 ± 0.09 、 0.44 ± 0.12 ,3 组间比较,差异有统计学意义($F = 68.754$, $P < 0.05$)。miR-145 组 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平低于 NC 组、对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组与 NC 组 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。

达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 4。



注:A 为 3 组 MMP-2 mRNA 表达水平比较;B 为 3 组 MMP-9 mRNA 表达水平比较;* 为与 miR-145 组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 3 组卵巢癌细胞中 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达水平比较

3 讨 论

卵巢癌的发病率位于女性生殖系统恶性肿瘤的第 3 位,仅次于宫颈癌及子宫内膜癌,但其病死率位于女性生殖系统恶性肿瘤的首位^[1]。卵巢癌的发病机制尚未完全明确,这导致其治疗研究也未取得较好的成果,目前卵巢癌多采用一些常规的治疗方法,如手术治疗、术后化疗等,但上述方法均无法有效控制肿瘤细胞的增殖和迁移。因此,找到抑制卵巢癌细胞生长、增殖、迁移的有效方法对临床治疗具有重要意义。

大量研究表明,miR-145 在卵巢癌中扮演着抑癌基因的角色,卵巢癌细胞在过表达 miR-145 后,其体外增殖、迁移等能力均明显下降;miR-145 能明显抑制卵巢癌细胞的增殖和迁移,加速卵巢癌细胞的凋亡^[7-9]。本研究中,相较于 NC 组与对照组,miR-145 组卵巢癌细胞大量凋亡、增殖减低、迁移能力减弱,与上述研究结果相同。此外,miR-145 在人体多种恶性肿瘤中表达水平降低,而高表达 miR-145 可抑制恶性肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力,促进细胞凋亡^[10-11]。

MMP-2 及 MMP-9 主要通过降解细胞外基质中的Ⅳ型胶原,参与血管生长因子的形成,促进肿瘤血管新生,在肿瘤侵袭和转移中发挥重要作用^[6]。李文婷等^[12]的动物实验研究结果显示,miR-145 能通过下调 MMP-9 抑制肿瘤坏死因子-α 诱导的大鼠脑动脉血管平滑肌细胞的增殖和迁移。肖雪莲等^[13]的研究结果显示,miR-145 可通过抑制 wnt/β-catenin 通路下调肺腺癌细胞 A549 中 MMP-2 的表达。本研究中,miR-145 组卵巢癌细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白与 mRNA 表达水平均低于 NC 组和对照组,提示在卵巢癌细胞中 miR-145 的表达可能对 MMP-2、MMP-9 的表达具有一定的抑制作用,考虑 miR-145 可能是通过抑制 MMP-2、MMP-9 在卵巢癌细胞中的表达来抑制卵巢癌细胞的增殖、迁移,加速卵巢癌细胞凋亡。有研究表明,miR-145 的表达水平升高能明显影响卵巢癌细胞的活性,且 miR-145 与卵巢癌的恶性程度关系密切,与卵巢癌的治疗有效率及复发率也有一定关系^[5],说明在卵巢癌的发生、发展过程中,miR-145 发挥着关键作用。

综上所述,miR-145 可抑制卵巢癌细胞的增殖、迁移,促进凋亡,其作用机制可能与降低 MMP-2、MMP-9 表达水平有关,miR-145 可作为卵巢癌治疗的新靶点。

参考文献

[1] 马丽芳,周琦,李蓉. 贝伐单抗联合化疗对铂敏感型复发

性卵巢癌的近期疗效及安全性研究[J]. 重庆医学,2017,46(11):1532-1535.

[2] 周能芳. 免疫细胞治疗联合化疗治疗晚期卵巢癌患者的疗效及对细胞免疫的影响[J]. 现代肿瘤医学,2018,26(3):436-440.

[3] YUAN X,ZHANG J,LI D,et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in ovarian cancer:a meta-analysis[J]. Gynecol Oncol,2017,147(1):181-187.

[4] SÖLÉTORMOS G,DUFFY M J,HASSAN S O A,et al. Clinical use of cancer biomarkers in epithelial ovarian cancer: updated guidelines from the European group on tumor markers[J]. Int J Gynecol Cancer,2017,75(1):284-298.

[5] 刘妍,刘颖,俊梅. 卵巢癌患者血清 CD133 和 miR-145 的表达与临床病理特征及预后的关系[J]. 中国妇幼保健,2017,32(14):3155-3158.

[6] 冯云云,武春艳,詹瑛. miR-145 在浆液性卵巢癌中的表达及对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的影响[J]. 现代肿瘤医学,2018,26(24):3919-3923.

[7] WANG L,WU X,WANG B,et al. Mechanisms of miR-145 regulating invasion and metastasis of ovarian carcinoma[J]. Am J Transl Res,2017,9(7):3443-3451.

[8] JI H,LIU N,YIN Y,et al. Oxytocin inhibits ovarian cancer metastasis by repressing the expression of MMP-2 and VEGF[J]. J Cancer,2018,9(8):1379-1384.

[9] KUNTE M,DESAI K. The protein extract of chlorella minutissima inhibits the expression of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in cancer cells through upregulation of TIMP-3 and down regulation of c-Jun[J]. Cell J,2018,20(2):211-219.

[10] 孙健,张磊,房丹. RECK 及 MMP-2、MMP-9 在神经母细胞瘤组织中的表达与肿瘤侵袭转移研究[J]. 中华小儿外科杂志,2019,40(2):167-171.

[11] PISO P,DAHLKE M H,LOSS M,et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in peritoneal carcinomatosis from ovarian cancer [J]. World J Surg Oncol,2004,2:21.

[12] 李文婷,邹伟,曹琳,等. miR-145 靶向抑制 MMP-9 表达 对大鼠脑动脉血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响[J]. 山东医药,2017,57(26):25-28.

[13] 肖雪莲,杨大恒,魏佳,等. miR-145 抑制肺腺癌细胞 A549 中 MMP2 的表达[J]. 临床检验杂志,2018,36(2):102-105.

(收稿日期:2020-07-10 修回日期:2020-11-21)