

## miR-200c 靶向调控 DNMT1 诱导卵巢癌细胞对紫杉醇的敏感性

谭志琴,万兰,杨春秀,文玉华

(中国人民解放军第 458 医院妇产科,广东 广州 510060)

**【摘要】** 目的 研究 miR-200c 调控人类卵巢癌对紫杉醇敏感性的影响及其作用机制。方法 培养卵巢癌 SKOV3 细胞,将 SKOV3 细胞分为 miR-200c 模拟物组、无关序列对照组及单药组,三组均分别采用 0 ng/mL、25 ng/mL、100 ng/mL、400 ng/mL 紫杉醇处理,miR-200c 模拟物组转染 miR-200c 模拟物,无关序列对照组转染无关序列,单药组不转染任何序列,MTT 法检测不同浓度紫杉醇及联合 miR-200c 对卵巢癌细胞增殖能力的影响;AnnexinV-FITC/PI 法检测不同浓度紫杉醇及联合 miR-200c 对卵巢癌细胞凋亡能力的影响;Western blot 试验检测紫杉醇联合 miR-200c 模拟物对 DNMT1 蛋白表达的影响。**结果** MTT 结果显示,不同浓度紫杉醇处理后三组的卵巢癌细胞的增殖能力随紫杉醇浓度的增加而逐渐下降,miR-200c 模拟物组 SKOV3 细胞的增殖能力与无关序列对照及单药组比较均明显下降,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),而无关序列对照与单药组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );AnnexinV-FITC/PI 法结果显示,不同浓度紫杉醇处理后三组的 SKOV3 细胞的凋亡率随紫杉醇浓度的增加而逐渐增加,miR-200c 模拟物组 SKOV3 细胞的凋亡率与无关序列对照及单药组比较均明显增加,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),而无关序列对照与单药组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );Western blot 试验结果显示,miR-200c 模拟物与紫杉醇共处理组 SKOV3 细胞中 DNMT1 的蛋白表达水平较单独转染 miR-200c 模拟物组明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** miR-200c 可通过调控靶蛋白 DNMT1 的表达促进卵巢癌细胞对紫杉醇的敏感性。

**【关键词】** miR-200c; 卵巢癌细胞; 甲基化转移酶 3A; 紫杉醇; 敏感性

**【中图分类号】** R737.31   **【文献标识码】** A   **【文章编号】** 1003—6350(2018)13—1780—03

**miR-200c induced ovarian cancer cell sensitivity to paclitaxel by targeting DNMT1.** TAN Zhi-qin, WAN Lan, YANG Chun-xiu, WEN Yu-hua. Department of Obstetrics and Gynecology, the 458<sup>th</sup> Hospital of Chinese PLA, Guangzhou 510060, Guangdong, CHINA

**【Abstract】 Objective** To study the effect of miR-200c on the sensitivity of human ovarian cancer to paclitaxel and its mechanism. **Methods** Ovarian cancer SKOV3 cells were cultured. The SKOV3 cells were divided into miR-200c mimics group, unrelated sequence control group and single drug group. All three groups were treated with 0 ng/mL, 25 ng/mL, 100 ng/mL, 400 ng/mL paclitaxel, respectively. The miR-200c mimic was transfected into the miR-200c mimic group, the unrelated sequence negative group was transfected with unrelated sequence, and the single drug group was not transfected with any sequence. The proliferation ability of SKOV3 cells in the different concentrations of paclitaxel and combined miR-200c were detected by tetrazolium (MTT) assay. The apoptosis rate of SKOV3 cells in different concentrations of paclitaxel and combined miR-200c were detected by AnnexinV-FITC/PI assay. The protein expression of DNMT1 of SKOV3 cells in paclitaxel and combined miR-200c mimic was detected by Western blot. **Results** MTT results showed that the proliferation ability of SKOV3 cells decreased gradually with the increase of paclitaxel concentration in different concentrations of paclitaxel-treated groups, and the proliferative capacity of SKOV3 cells in the miR-200c mimics group was significantly decreased compared with the unrelated sequence control group and single drug group ( $P<0.05$ ), with no significant difference between the unrelated sequence control group and single drug group ( $P>0.05$ ). The AnnexinV-FITC/PI method showed that the apoptotic rate of SKOV3 cells gradually increased with the increase of paclitaxel concentration in different concentrations of paclitaxel-treated groups, and the apoptotic rate of SKOV3 cells in the miR-200c mimics group was significantly increased compared with the unrelated sequence control group and single drug group ( $P<0.05$ ), with no significant difference between the unrelated sequence control group and single drug group ( $P>0.05$ ). Western blot results showed that the expression of DNMT1 protein in the SKOV3 cells co-treated with miR-200c mimic and paclitaxel was significantly lower than that of miR-200c mimic alone ( $P<0.05$ ). **Conclusion** miR-200c can promote the sensitivity of ovarian cancer cells to paclitaxel by targeting the DNMT1.

**【Key words】** miR-200c; Ovarian cancer cell; Methyltransferase 3A; Paclitaxel; Sensitivity

卵巢癌是妇科肿瘤死亡率最高的疾病之一,晚期患者的生存率极低,虽然放化疗和手术治疗均取得了很大的进步,但卵巢癌的复发率和耐药率仍然居高不下,给卵巢癌的治疗带来了极大的困难<sup>[1]</sup>。

MicroRNAs (miRNAs)是一类含有 18~25 个核苷酸的内源性非编码 RNAs 分子,其主要通过调节真核基因 mRNA 的活性或转录,从而发挥其负向调控作用<sup>[2]</sup>。大量的研究发现,miRNAs 参与多种肿瘤发生发展等

生物学过程,可调控细胞的增殖、凋亡、侵袭转移以及耐药,使癌基因和抑癌基因表达出现异常,从而引起各种肿瘤的发生,因此可作为一类与肿瘤诊断与预后相关分子标志物<sup>[3]</sup>。近年来,miRNAs在化疗药物敏感性下降以及药物抵抗中所起的作用引起人们广泛的关注,有研究表明,miRNA可通过调节细胞凋亡调节因子和药物转运蛋白等影响肿瘤细胞对化疗药物的敏感性<sup>[4]</sup>。miR-200家族的成员有miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-429、miR-141。研究发现,miR-200b和miR-200c都具有肿瘤抑制因子的作用,miR-200c可抑制乳腺癌的发生发展,并且抑制乳腺癌干细胞的生长和自我更新能力<sup>[5-6]</sup>。miR-200c可通过ZEB1/E-cadherin非依赖的和ZEB1/E-cadherin依赖这两条信号通路来调节乳腺癌的干细胞特性,从而抑制了乳腺癌干细胞的驱动肿瘤的能力<sup>[7-8]</sup>。为了阐明miR-200c是否会影响紫杉醇对卵巢癌细胞的敏感性,本研究通过研究miR-200c与紫杉醇对卵巢癌细胞的影响,旨在为卵巢癌的治疗提供新的治疗靶点。

## 1 材料与方法

1.1 材料 PRIM1640培养基、小牛血清均购自Gibco公司;人类卵巢癌细胞株SKOV3细胞由中山大学肿瘤研究所惠赠;miR-200c mimics、无关序列、Lipofectamine2000购于美国Invitrogen公司;AnnexinV-FITC/PI细胞凋亡双染试剂盒购于北京生东科技有限公司;紫杉醇购自Roche公司;MTT购于美国Sigma公司;RIPA裂解液购于上海碧云天公司;DNMT1和β-actin抗体以及二抗购于美国Santa Cruz公司。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将卵巢癌SKOV3细胞接种于含10%小牛血清的PRIM1640培养基中,培养于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中,分别采用0 ng/mL、25 ng/mL、100 ng/mL、400 ng/mL紫杉醇注射液处理卵巢癌SKOV3细胞48 h,然后再将miR-200c模拟物和无关序列对照分别转染于上述经不同浓度紫杉醇处理的SKOV3细胞中。因此SKOV3细胞分为三组,即miR-200c模拟物组、无关序列对照组和单药组。

1.2.2 MTT实验 分别取上述三组SKOV3细胞接种于96孔板中,每孔细胞数为6 000个,每组设5个复孔,待细胞培养48 h后,再每孔加灭菌MTT液(5 mg/mL)20 μL,继续在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中孵育3 h后取出,在多功能酶标仪上选择波长为490 nm,测定各孔吸光值,然后记录结果,算出每个药物浓度的平均吸光度(A)值,实验独立重复3次。

1.2.3 AnnexinV-FITC/PI凋亡实验 细胞分组同上,收集各组培养至80%密度左右的细胞,用胰酶将细胞消化下来,再用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞2次,取约1×10<sup>6</sup>个细胞,加入300 μL的1×Binding Buffer重悬细胞,再加5 μL Annexin V-FITC轻轻混匀,室温避光孵育15 min后,加入1 μL PI混匀,再补加200 μL的1×Binding Buffer后上机,流式细胞仪检测。

1.2.4 Western blot实验 将miR-200c模拟物分别转染于经0 ng/mL与25 ng/mL紫杉醇处理的SKOV3细胞中,细胞分为miR-200c模拟物与紫杉醇+miR-200c模拟物组,待细胞培养48 h后,用PBS液洗涤细胞3次,RIPA裂解细胞并提取两组细胞总蛋白,用BCA法测定细胞的蛋白浓度,取等量的总蛋白样品在10%SDS-PAGE凝胶电泳中分离后,再转至PVDF膜上。用含有5%脱脂奶粉的TBST室温下封闭2 h,分别加入鼠抗人DNMT1(1:1 000)和兔抗人β-actin(1:2 500)一抗4℃孵育过夜。用TBST洗膜3次用于除去多余的一抗,加入二抗,室温下孵育2 h,再用TBST洗膜3次,在暗室中用ECL化学发光试剂显色,压片显影。显示结果于X光片,扫描图片,并计算结果。

1.3 统计学方法 应用SPSS13.0软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用独立t检验,多组间比较采用One-way ANOVA分析,均以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同浓度紫杉醇及联合miR-200c对卵巢癌细胞增殖能力的影响 MTT实验结果显示,SKOV3细胞的增殖能力随紫杉醇浓度的增加而逐渐下降,miR-200c模拟物组SKOV3细胞的增殖能力与无关序列对照及单药组比较均明显下降,差异均有统计学意义(P<0.05),而无关序列对照组与单药组比较差异无统计学意义(P>0.05),见表1。

表1 各组细胞OD值的比较( $\bar{x} \pm s$ ,n=3)

组别	紫杉醇浓度(ng/mL)			
	0	25	100	400
无关序列对照	0.726±0.018	0.603±0.014	0.501±0.007	0.417±0.012
单药组	0.738±0.009	0.614±0.021	0.492±0.011	0.406±0.015
miR-200c模拟物组	0.602±0.011 <sup>a</sup>	0.463±0.007 <sup>a</sup>	0.328±0.007 <sup>a</sup>	0.246±0.006 <sup>a</sup>
F值	112.40	160.68	205.35	411.26
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与无关序列对照组和单药组比较,<sup>a</sup>P<0.05。

**2.2 不同浓度紫杉醇及联合 miR-200c 对卵巢癌细胞凋亡的影响** 通过 AnnexinV-FITC/PI 实验对卵巢癌各细胞的凋亡情况进行检测,结果显示,卵巢癌细胞的凋亡率随紫杉醇浓度增加而呈现上升趋势;

表2 各组细胞凋亡率比较(%, $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	紫杉醇浓度(ng/mL)			
	0	25	100	400
无关序列对照	3.44±0.79	12.68±1.48	17.24±1.99	22.38±2.36
单药组	4.02±0.82	11.74±1.32	17.85±2.13	24.01±3.27
miR-200c 模拟物组	10.03±1.38 <sup>a</sup>	24.17±2.79 <sup>a</sup>	29.85±4.92 <sup>a</sup>	37.86±6.17 <sup>a</sup>
F 值	91.37	67.10	32.13	76.46
P 值	0.000	0.000	0.001	0.000

注:与无关序列对照组和单药组比较,<sup>a</sup>P<0.05。

**2.3 紫杉醇联合 miR-200c 对 DNMT1 蛋白表达的影响** Western blot 检测结果显示,miR-200c 模拟物与紫杉醇共处理组卵巢癌细胞中的 DNMT1 的蛋白表达灰度值为(0.408±0.028),较单独转染 miR-200c 模拟物组的(0.981±0.127)明显降低,差异具有统计学意义(P<0.05)。

### 3 讨论

卵巢癌是全球女性肿瘤死亡的主要原因之一。由于早期症状不明显和缺乏可靠的早期诊断指标,给卵巢癌的早期诊断带来巨大困难。近年来,miRNAs 在肿瘤生物学功能中的研究是热点,其不仅调控细胞正常的新陈代谢还参与肿瘤的形成,同时还可逆转肿瘤细胞对化疗药物敏感性<sup>[1]</sup>。在肿瘤的发生发展过程中,miRNAs 的生物学功能并不单一,miR-21 的下调不仅能促进卵巢癌细胞凋亡,还能调节细胞对化疗药物的敏感性<sup>[9]</sup>。Farina 等<sup>[10]</sup>研究发现,miR-26a 下调 p35 的表达从而促进淋巴瘤的凋亡,miR-21-3p 可靶向调控 NAV3 基因降低卵巢癌细胞对紫杉醇敏感性<sup>[11]</sup>,不同的 miRNAs 可通过靶向调控不同的基因发挥不同生物学作用。我们的研究发现 miR-200c 能增强紫杉醇对卵巢癌细胞的敏感性,明显抑制细胞增殖和促进细胞凋亡。

DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 定位于 19p13.22p13.3, 是人体内重要的甲基转移酶之一,该基因一共编码 1 495 个氨基酸。研究发现,人体内 DNMT1 活性增高与细胞的异常增殖分化、抑癌基因的高度甲基化等相关<sup>[12]</sup>。DNMT1 在多种肿瘤细胞中均有异常表达,比如,非小细胞肺癌,乳腺癌,肝癌和胃癌等<sup>[12-14]</sup>。Liu 等<sup>[13]</sup>研究发现,DNMT1 可促进肝癌细胞对索拉非尼的耐受性。Si 等<sup>[14]</sup>发现,过表达 DNMT1 和 DNMT3b 后能明显降低乳腺癌对紫杉醇的敏感性。本次研究进一步发现,miR-200c 可明显抑制卵巢癌细胞中 DNMT1 的表达,从而增强卵巢癌细胞对紫杉醇的敏感性。

综上所述,miR-200c 能增强紫杉醇对卵巢癌细胞的抗癌敏感性,其作用可能与靶向调控 DNMT1 有关。本研究结果提示 miR-200c 可作为一个潜在的治疗靶点,今后在卵巢癌的治疗中可能发挥重要作用。

miR-200c 模拟物组 SKOV3 细胞的凋亡率与无关序列对照及单药组比较均明显增加,差异均具有统计学意义(P<0.05)。而无关序列对照组与单药组比较,差异无统计学意义(P>0.05),见表2。

### 参 考 文 献

- 杨纯,蔡晶,胡沙,等. microRNA let-7e 逆转人卵巢癌细胞顺铂耐药及其作用机制[J]. 现代妇产科进展, 2014, 23(11): 868-871.
- McCreight JC, Schneider SE, Wilburn DB, et al. Evolution of microRNA in primates [J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0176596.
- Chen B, Zhang D, Kuai J, et al. Upregulation of miR-199a/b contributes to cisplatin resistance via Wnt/β-catenin-ABCG2 signaling pathway in ALDH1<sup>+</sup> colorectal cancer stem cells [J]. Tumour Biol, 2017, 39(6): 1010428317715155.
- Iliopoulos D, Lindahl-Allen M, Polytarchou C, et al. Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells [J]. Mol Cell, 2010, 39(5): 761-772.
- Shimono Y, Zabala M, Cho RW, et al. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells [J]. Cell, 2009, 138(3): 592-603.
- Radisky DC. miR-200c at the nexus of epithelial-mesenchymal transition, resistance to apoptosis, and the breast cancer stem cell phenotype [J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(3): 110.
- Howe EN, Cochrane DR, Richer JK. Targets of miR-200c mediate suppression of cell motility and anoikis resistance [J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(2): R45.
- Fu Q, Chen Z, Gong X, et al. Beta-Catenin expression is regulated by an IRES-dependent mechanism and stimulated by paclitaxel in human ovarian cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 461(1): 21-27.
- Chan JK, Blansit K, Kiet T, et al. The inhibition of miR-21 promotes apoptosis and chemosensitivity in ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2014, 132(3): 739-744.
- Farina FM, Inguscio A, Kunderfranco P, et al. MicroRNA-26a/cyclin-dependent kinase 5 axis controls proliferation, apoptosis and *in vivo* tumor growth of diffuse large B-cell lymphoma cell lines [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(6): e2890.
- Pink RC, Samuel P, Massa D, et al. The passenger strand, miR-21-3p, plays a role in mediating cisplatin resistance in ovarian cancer cells [J]. Gynecol Oncol, 2015, 137(1): 143-151.
- Wang X, Li B. DNMT1 regulates human endometrial carcinoma cell proliferation [J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 1865-1873.
- Liu J, Liu Y, Meng L, et al. Targeting the PD-L1/DNMT1 axis in acquired resistance to sorafenib in human hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Rep, 2017 38(2): 899-907.
- Si X, Liu Y, Lv J, et al. ERα propelled aberrant global DNA hypermethylation by activating the DNMT1 gene to enhance anticancer drug resistance in human breast cancer cells [J]. Oncotarget, 2016, 7 (15): 20966-20980.

(收稿日期:2017-11-02)