

廖年春, 张潇迪, 刘珏. miR-200b 与 miR-200c 靶向 DNA 甲基转移酶对卵巢癌细胞顺铂耐药性的影响[J]. 中南医学科学杂志, 2022, 50(2): 190-193.

· 基础医学 ·

DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2022.02.008

miR-200b 与 miR-200c 靶向 DNA 甲基转移酶对 卵巢癌细胞顺铂耐药性的影响

廖年春, 张潇迪, 刘珏

(南华大学衡阳医学院附属第二医院妇产科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] miR-200b; miR-200c; DNA 甲基转移酶; 卵巢癌; 顺铂; 耐药

[摘要] 目的 探讨 miR-200b 与 miR-200c 靶向 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)、DNMT3A 和 DNMT3B 对卵巢癌细胞顺铂耐药性的影响。方法 以人卵巢癌细胞株(A2780)、人卵巢癌顺铂耐药细胞株(A2780/DDP)作为研究对象,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 A2780、A2780/DDP 细胞株中 miR-200b 与 miR-200c 表达量。耐药细胞株 A2780/DDP 转染后分为 si-miR-200b 组、si-miR-200c 组、si-NC 组,MTT 法检测转染后 3 组细胞 IC₅₀ 值;蛋白印迹免疫法(Western blotting)检测转染后 3 组细胞 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白表达水平;流式细胞术检测转染后细胞凋亡率。结果 qRT-PCR 结果显示 A2780 细胞系中 miR-200b 与 miR-200c 表达高于 A2780/DDP 细胞系($P < 0.05$)。si-miR-200b 组和 si-miR-200c 组 IC₅₀ 值、DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白表达水平低于 si-NC 组($P < 0.05$)。结论 miR-200b 与 miR-200c 高表达能抑制 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 基因表达,从而逆转卵巢癌细胞对顺铂的耐药性。

[中图分类号] R737.31

[文献标识码] A

Effects of miR-200b and miR-200c targeted DNA methyltransferases on cisplatin resistance in ovarian cancer cells

LIAO Nianchun, ZHANG Xiaodi, LIU Jue

(Department of Gynaecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] miR-200b; miR-200c; DNA methyltransferase; ovarian cancer; cisplatin; drug resistance

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of miR-200b and miR-200c targeted DNA methyltransferase 1 (DNMT1), DNMT3A and DNMT3B on cisplatin resistance of ovarian cancer cells. **Methods** Human ovarian cancer cell line (A2780) and human ovarian cancer cisplatin-resistant cell line (A2780/DDP) were used as research objects, and the expression levels of miR-200b and miR-200c in A2780 and A2780/DDP cells were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). Drug-resistant cell line A2780/DDP were transfected into si-miR-200b group, si-miR-200c group and si-NC group. IC₅₀ values of the three groups were detected by MTT assay. Western blotting was used to detect the protein expression levels of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B after transfection. The apoptosis rate of transfected cells was detected by flow cytometry. **Results** qRT-PCR showed that the expression of miR-200b and miR-200c in A2780 cell line was higher than that in A2780/DDP cell line ($P < 0.05$). The IC₅₀ value and protein expression levels of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in si-miR-200b and si-miR-200c groups were lower than those in si-NC group ($P < 0.05$). **Conclusion** High expression of miR-200b and miR-200c can inhibit the expression of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B genes, thereby reversing the resistance of ovarian cancer cells.

卵巢癌是女性生殖系统发病率排名第 2 的恶性肿瘤,其病死率在妇科肿瘤中排第 1 位^[1]。目前卵

巢癌首选治疗方案为外科手术和术后以顺铂为基础的化疗,但治疗后有约 60% 的患者会出现临床复

[收稿日期] 2021-01-22

[修回日期] 2021-12-06

[基金项目] 湖南省临床医疗技术创新引导计划(2018SK51509);湖南省卫生健康委科研课题(B2019115)

[作者简介] 廖年春,硕士研究生,研究方向为妇科肿瘤的治疗,E-mail 为 2523712454@qq.com。通信作者刘珏,硕士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为妇科肿瘤学的治疗,E-mail 为 lj3457@163.com。

发且 5 年生存率小于 45%,复发的主要原因是患者对顺铂产生了耐药性^[2]。

miRNA 是一种普遍存在于真核生物细胞中长度约为 18~25 个核苷酸的非编码小分子 RNA^[3]。miRNA 的异常表达与肿瘤细胞的增殖、生长、侵袭和凋亡密切相关^[4]。真核生物中存在 3 种甲基转移酶(DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B),其中 DNMT1 主要起维持甲基化的作用,而 DNMT3A 和 DNMT3B 主要起形成甲基化的作用^[5]。miRNA-200 是一个较特殊的 miRNA 家族,其家族成员在多种肿瘤中参与调控 DNA 甲基化^[6]。本文观察 miR-200b 与 miR-200c 靶向 DNA 甲基转移酶对卵巢癌细胞顺铂耐药性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

人卵巢癌细胞株(A2780)和人卵巢癌细胞株(A2780/DDP)购于长沙丽欣生物有限公司,1640 培养基购于美国 Gibco 公司,胎牛血清购于以色列 Biological Industries 公司,青链霉素混合液(100×)、顺铂购于北京 Solarbio 公司。完全培养基即 RPMI-1640 培养基(含 100 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素双抗)+10% 胎牛血清(FBS)。

miR-200b、miR-200c、U6 引物序列、miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒购于上海生工,miR-200b mimics、miR-200c mimics 及阴性对照物转染试剂购于吉玛基因,0.25% 胰酶购于美国 HyClone, lipo2000 购于 Invitrogen 公司,二甲基亚砜(DMSO)购于德国 Sigma-Aldrich, DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 抗体购于 CST 公司, GAPDH 抗体购于 Bioworld 公司,鼠二抗及兔二抗购于美国 Sigma 公司, miRNA 提取分离试剂盒购于北京天根生化科技有限公司, PCR 试剂盒购于赛默飞。

1.2 qRT-PCR 检测 miR-200b 与 miR-200c 表达量

取对数生长期细胞,弃去原培养液, PBS 清洗 1~2 次, miRNA 提取分离试剂盒分别提取 A2780、A2780/DDP 细胞中总 miRNA, 采用 miRNA 第一链 cDNA 合成(茎环法)试剂盒进行逆转录获得 cDNA。以 cDNA 为模板,用 U6 作为检测的内参基因,进行 qRT-PCR 测定细胞中 miR-200b 与 miR-200c 水平。引物序列:miR-200b 正向引物序列:5'-GCGCATCT-TACTGGCAGC-3',反向引物序列:5'-AGTGCAGG-TCCGAGGTATT-3'; loop-RT 引物序列:5'-GTCG-TATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATA

CGACTCCAAT-3'。miR-200c 正向引物序列:5'-GCGCGTCTTACCCAGCAGT-3',反向引物序列:5'-ACTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'; loop-RT 引物序列:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCAC TGGATACGACCCAAAC-3'。U6 正向引物序列:5'-AGAGAAGATTAGCATGGCCCCTG-3',反向引物序列:5'-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3'; loop-RT 引物序列:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAA ATA-3'。PCR 扩增条件如下:94 ℃ 30 s 1 个循环,随后 94 ℃ 5 s,55 ℃ 15 s,72 ℃ 10 s,40 个循环。分别计算 miR-200b 与 miR-200c 的相对表达量,结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析。每孔设置 3 个平行样本,每组实验重复 3 次。

1.3 细胞转染及细胞分组

取顺铂耐药细胞株 A2780/DDP 于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中,在 5% CO₂、37 ℃ 饱和湿度条件下传代培养。将 2.0×10^5 个/mL 的细胞接种于 6 孔培养板培养 24 h 后,在细胞达 70%~90% 左右按转染试剂说明书对 A2780/DDP 细胞株进行 miR-200b mimics、miR-200c mimics 及阴性对照转染,分为 si-miR-200b 组、si-miR-200c 组、si-NC 组,转染后放入恒温细胞培养箱中培养 4~6 h 后换液。转染后 1~2 天处理细胞行后续实验步骤。

1.4 MTT 法检测细胞 IC50 值

在 6 孔板细胞转染 24 h 后,取对数生长期细胞,0.25% 胰酶消化后移至离心管中,离心收集细胞并加入培养基制成单个细胞悬液。加 200 μ L 细胞接种至 96 孔板中,使每孔细胞含量为 2 000 个,每样品设置 7 个平行浓度,加入浓度梯度 0、5、10、20、40、80、160 μ mol/L DDP 48 h 后每孔加 5 g/L MTT 溶液,孵育 4 h,继而每孔加 150 μ L DMSO 并振荡 5 min。酶标仪在 492 nm 处测定达到预定时间后的各孔光密度值(OD),用 SPSS 软件计算各组细胞 IC50 值。

1.5 Western blotting 法检测转染后 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白表达水平

转染 48 h 后取各组细胞,在冰上进行提取蛋白操作,弃去原培养液,4 ℃ 预冷的 PBS 溶液洗 2~3 次,每孔加入蛋白裂解液 200 μ L(RIPA:PMSF=100:1)提取总蛋白,取部分蛋白溶液用于 BCA 测定蛋白水平,按配方配置 8% 分离胶,依次进行电泳、转膜、封闭,封闭 2 h 后分别加入 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B(均为兔单抗)蛋白稀释(1:1 000)后的一抗,GAPDH 作为内参稀释(1:5 000),4 ℃ 孵育过夜,12 h 后,回收一抗,TBST 摇床洗去残留一抗,

10 min/次,洗3次,加入稀释的兔二抗(1:5 000),室温避光孵育2 h, TBST洗去残留二抗,10 min/次,洗3次,最后显影。计算 DNMTs/GAPDH 比值,即表示 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 相对表达水平。每组实验重复3次。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

各组细胞加入 DDP 室温孵育 48 h,随后加入 Annexin V-PE 结合液混匀,避光室温孵育 15 min。采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.7 统计学方法

应用 SPSS25.0 统计软件分析,组间比较采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用 Graph Pad Prism8 统计绘图。

2 结果

2.1 A2780 和 A2780/DDP 中 miR-200b 与 miR-200c 的表达情况

miR-200b 与 miR-200c 在 A2780 细胞株的表达量均明显高于 A2780/DDP 细胞株($P < 0.05$;图 1)。

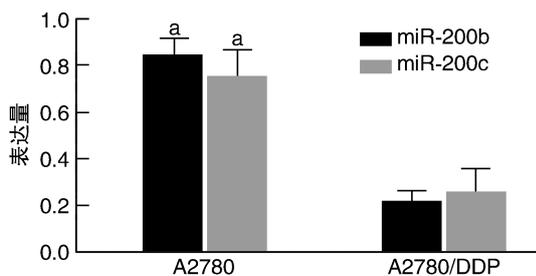


图 1 A2780 和 A2780/DDP 细胞株中 miR-200b 与 miR-200c 的表达量

a 为 $P < 0.05$,与 A2780/DDP 组比较。

2.2 转染后各组细胞 IC50 值情况

si-miR-200b 组、si-miR-200c 组 IC50 值明显低于 si-NC 组($P < 0.05$;图 2)。

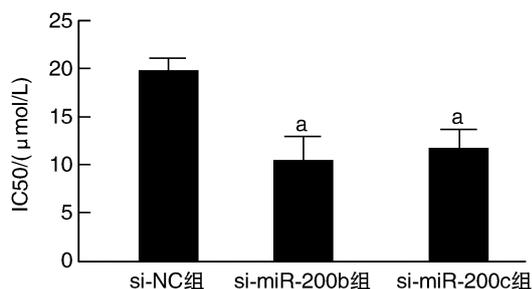


图 2 A2780/DDP 细胞株中各组 IC50 值比较

a 为 $P < 0.05$,与 si-NC 组比较。

2.3 转染后各组细胞 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白表达水平情况

si-miR-200b 组、si-miR-200c 组 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白表达水平低于 si-NC 组($P < 0.05$;图 3)。

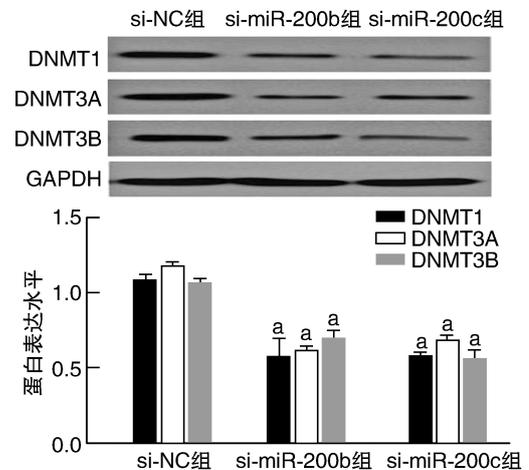


图 3 A2780/DDP 细胞株转染后各组细胞中 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 蛋白的相对表达量

a 为 $P < 0.05$,与 si-NC 组比较。

2.4 转染后各组细胞凋亡率情况

转染后 A2780/DDP 细胞株的各组细胞随顺铂浓度的增加,凋亡率逐渐增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。在相同浓度药物处理下,si-miR-200b 组、si-miR-200c 组凋亡率高于 si-NC 组($P < 0.05$),而 si-miR-200b 组、si-miR-200c 组无统计学意义($P > 0.05$;图 4)。

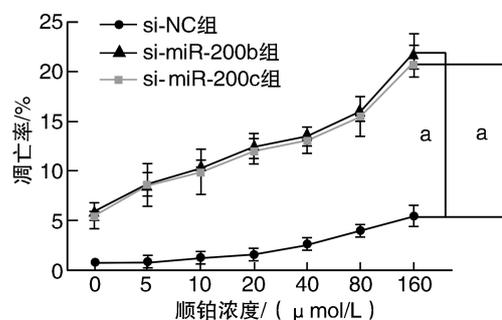


图 4 转染后各组细胞凋亡率的比较

a 为 $P < 0.05$,与 si-NC 组同浓度比较。

3 讨论

卵巢癌为妇科三大肿瘤之一,其治疗手段一直是研究热点,近几年的治疗手段也取得了不错的成果,但术后的顺铂耐药仍然是影响卵巢癌患者术后

生存率的重要问题^[7]。

miRNA 直接或间接调节涉及药物代谢、药物运输、药物靶标和下游信号分子的基因的表达^[8]。越来越多的研究表明,miRNA 可以调节药物代谢酶和转运蛋白基因表达,改变肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,从而影响治疗效果^[8-10]。Lee 等^[11]发现,miR-200 家族在 EEC 中高表达,并可能在癌症生长中发挥重要作用,用抗 miR-429 转染可以增强 EEC 中顺铂的细胞毒活性。Sun 等^[12]发现,miR200 家族可能通过 ZEB1/pSMAD3 下调 MMP3,从而抑制了卵巢癌细胞的侵袭和转移。Lynch 等^[13]发现,miR-200c 和 miR-141 在前列腺癌中的异常表达可能作为前列腺癌的诊断和预后方面的新型生物标志物或治疗干预的重点。本文实验通过 qRT-PCR 技术发现在人卵巢癌细胞株 A2780 中,miR-200b、miR-200c 的表达均明显高于人卵巢癌顺铂耐药细胞株 A2780/DDP,通过细胞转染技术用 miR-200b、miR-200c 的模拟物对 A2780/DDP 细胞株进行转染,发现 miR-200b、miR-200c 能增强 A2780/DDP 细胞对顺铂药物的敏感性并增加 A2780/DDP 细胞的凋亡,表明 miR-200b、miR-200c 能增加卵巢癌细胞对顺铂药物的敏感性并逆转耐药细胞的耐药性。

近年来表观遗传学备受关注,主要包括异常 DNA 甲基化、组蛋白修饰表达谱以及非编码 RNA 表达等^[9]。表观遗传改变可通过调节参与药物代谢和分布以及药物靶标的关键基因的表达来影响药物治疗,从而导致药物反应的个体差异。这些表观遗传学改变以及循环核酸的表观遗传学特征的改变,对药物治疗疗效的改变,甚至为个性化治疗提供生物标志物,特别是在癌症的治疗中^[10],具有不可忽视的潜力。DNMT 通常在各种癌症组织和细胞系中过表达。DNA 甲基化是可逆的,因此 DNMT 是药物开发的重要表观遗传学靶标^[14]。DNA 高甲基化可能是获得对顺铂耐药性的分子机制之一^[15]。癌症甲基化组中的多个 DNA 甲基化变化与耐药性的获得有关^[15]。在耐顺铂的卵巢癌中观察到 DNA 甲基转移酶的显著上调^[16]。本实验通过增加 A2780/DDP 细胞的 miR-200b、miR-200c 表达可显著抑制 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 的表达量。

本研究结果表明,增加 miR-200b 与 miR-200c

的表达可抑制 DNA 甲基酶的表达,增强顺铂耐药细胞 A2780/DDP 对 DDP 的灵敏度,增加卵巢癌细胞的凋亡,逆转耐药细胞株的耐药性。

[参考文献]

- [1] 陈慧,周思园,孙振球. 常见妇科三大恶性肿瘤的流行及疾病负担研究现状[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(6): 108-112.
- [2] TORRE L A, TRABERT B, DESANTIS C E, et al. Ovarian cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(4): 284-296.
- [3] 唐海林,武明花. miRNA 失调与肿瘤的发生发展[J]. 中南医学科学杂志, 2013, 41(1): 1-6.
- [4] CORREIA D M, GJORGJIEVA M, DOLICKA D, et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): 6249-6271.
- [5] 孙树汉. 肿瘤的表现遗传学研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(1): 8-13.
- [6] HOLUBEKOVA V, MENDELOVA A, JASEK K, et al. Epigenetic regulation by DNA methylation and miRNA molecules in cancer[J]. Future Oncol, 2017, 13(25): 2217-2222.
- [7] 李宁,吴令英. 中国临床肿瘤学会《卵巢癌诊疗指南(2021 年版)》更新要点[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(7): 720-723.
- [8] LI M P, HU Y D, HU X L, et al. MiRNAs and miRNA polymorphisms modify drug response[J]. Int J Environ Res Public Health, 2016, 13(11): 1096-1118.
- [9] 蔡馨梅,丁亮,刘晓曼,等. MicroRNA 在个体化用药的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(18): 2931-2935.
- [10] IVANOV M, KACEVSKA M, INGELMAN-SUNDBERG M. Epigenomics and interindividual differences in drug response[J]. Clin Pharmacol Ther, 2012, 92(6): 727-736.
- [11] LEE J W, PARK Y A, CHOI J J, et al. The expression of the miRNA-200 family in endometrial endometrioid carcinoma [J]. Gynecol Oncol, 2011, 120(1): 56-62.
- [12] SUN N X, ZHANG Q, XU C, et al. Molecular regulation of ovarian cancer cell invasion[J]. Tumor Biol, 2014, 35(11): 11359-11366.
- [13] LYNCH S M, O'NEILL K M, MCKENNA M M, et al. Regulation of miR-200c and miR-141 by methylation in prostate cancer[J]. Prostate, 2016, 76(13): 1146-1159.
- [14] ZHOU Z, LI H Q, LIU F. DNA methyltransferase inhibitors and their therapeutic potential[J]. Curr Top Med Chem, 2018, 18(28): 2448-2457.
- [15] ZELLER C, DAI W, STEELE N L, et al. Candidate DNA methylation drivers of acquired cisplatin resistance in ovarian cancer identified by methylome and expression profiling [J]. Oncogene, 2012, 31(42): 4567-4576.
- [16] DU J, ZHANG L. Integrated analysis of DNA methylation and microRNA regulation of the lung adenocarcinoma transcriptome[J]. Oncol Rep, 2015, 34(2): 585-594.

(此文编辑 蒋湘莲)