

# miR-26a 通过调节 MTDH 基因表达抑制 CAOV3 细胞系生长

王淑芬,董巍蕾,谢 晶,何 璐,周 曦,蔡艳林,刘 杰,谢宛玉

(南华大学附属第一医院妇产科,湖南 衡阳 421001)

**摘要:** 目的 检测 miR-26a 在卵巢癌组织的表达改变,明确 miR-26a 调控卵巢癌细胞生长的分子机制。方法 运用 qRT-PCR 检测 52 例卵巢癌及相应癌旁组织中 miR-26a 的表达改变;将 miR-26a mimics 转染卵巢癌细胞 CAOV3,以 MTDH siRNA 为阳性对照,采用 Western blot 检测其对 MTDH 蛋白表达水平的影响;然后采用 MTT 法检测高表达 miR-26a 对 CAOV3 细胞生长增殖的影响。结果 qRT-PCR 检测结果显示,miR-26a 在 52 例卵巢癌组织中表达下调;Western blot 结果显示,过表达 miR-26a 或干扰 MTDH 可抑制 MTDH 蛋白的表达。MTT 检测发现,过表达 miR-26a 或干扰 MTDH 可抑制人 CAOV3 细胞的生长( $P < 0.05$ )。结论 miR-26a 通过调节 MTDH 基因的表达而抑制卵巢癌细胞的生长。

**关键词:** miR-26a; 卵巢癌; 生长增殖

中图分类号:R737.31 文献标识码:A

## miR-26a Inhibits Ovarian Cancer Cells Proliferation by Regulating MTDH

WANG Shufen, DONG Weilei, XIE Jing, et al

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

**Abstract:** **Objective** To explicit the expression and role of miR-26a in ovarian cancer tissues and cells. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression of miR-26a in ovarian cancers and normal ovarian tissues. CAOV3 cells were transfected with miR-26a mimics, and MTDH siRNA as for positive control, then Western blotting was performed to detect the expression of MTDH protein. The proliferation ability of CAOV3 cells was evaluated by MTT assay. **Results** miR-26a was down-regulated in ovarian cancer tissues. Western blot showed that the expressions of MTDH protein was inhibited by restored miR-26a or siRNA MTDH in CAOV3 cells. Overexpression of miR-26a or siRNA MTDH inhibited the proliferation of CAOV3 cells. **Conclusion** miR-26a suppresses cell proliferation by regulating MTDH in ovarian cancer.

**Key words:** miR-26a; ovarian cancer; growth

microRNAs (miRNAs) 是一类非编码的内源性小 RNA 分子,通过与靶基因非编码区特异性碱基配对从而调控靶基因的表达。miRNAs 靶向调控大量的 mRNAs,通过与靶基因的 3' 非编码区相互结合,从而诱导 mRNA 降解或者抑制蛋白的翻译<sup>[1-2]</sup>。研究表明,miR-26a 存在于两个染色体位点,miR-26a-1 位于 3 号染色体,miR-26a-2 位于 12 号染色体。目前有关 miR-26a 在肿瘤中的作用的研究报道很少。研究表明 miR-26a 在肝癌中下调,其表达水

平与肝癌患者生存时间及对干扰素治疗的敏感性相关<sup>[3]</sup>。miR-26a 在鼻咽癌中表达下调且能通过靶基因组蛋白甲基化转移酶 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 抑制鼻咽癌细胞生长和致癌性<sup>[4]</sup>。同时 miR-26a 在乳腺癌组织和细胞中显著下调,miR-26a 模拟物能明显抑制乳腺癌细胞增殖生长。通过凋亡试剂盒检测发现,过表达 miR-26a 能诱导乳腺癌细胞凋亡<sup>[5]</sup>。miR-26a 在肝癌、鼻咽癌、胃癌以及乳腺癌组织和细胞中表达下调,且抑制肿瘤细胞的生长增殖<sup>[3-5]</sup>。MTDH,又名 AEG-1,在多种肿瘤如食管鳞癌、胃癌、肾细胞癌、前列腺以及非小细胞肺癌中表达上调<sup>[6-10]</sup>。Li C 等<sup>[11]</sup> 研究显示,MTDH 在晚期

黏液性卵巢癌中高表达,并且与患者的预后差和对顺铂耐药相关。目前对于 miR-26a 与 MTDH 在卵巢癌中的研究尚未见报道。本研究拟采用 qRT-PCR、Western blot 以及 MTT 法检测 miR-26a 在卵巢癌中的生物学作用及作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例资料

收集 2008 年 1 月~2013 年 7 月期间,本院收治确诊卵巢癌患者 52 例。所有患者术前未经任何化疗药物治疗,中位年龄 53 (39~70) 岁。病理诊断结果均经两名以上病理科医生确认,癌旁组织取自距癌组织 5 cm 以外。本次研究获得南华大学附一医院伦理组织批准以及研究对象的知情同意。

### 1.2 细胞株

CAOV3 为卵巢癌细胞株,由中山大学肿瘤防治中心惠赠。

### 1.3 主要材料

miR-26a mimics 及对照 mimics 购自 Ambion 公司。MTDH siRNA 质粒购自 santa cruz 公司。MTDH 抗体和  $\beta$ -actin 抗体购自 santa cruz 公司。Trizol 和 Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司。PRIMI640 培养基和胎牛血清为 Gibco 公司产品。MTS 细胞生长增殖/毒性检测试剂盒购自美国 Sigma 公司。

### 1.4 qRT-PCR

取适量组织,用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,逆转录合成 cDNA。PCR 扩增反应为 20  $\mu$ L 体系,包括: Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, 2  $\times$  SYBR Mix 10  $\mu$ L, miRNA RT product 2.0  $\mu$ L, MiR-PCR primers (5  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ L, 灭菌蒸馏水 7.4  $\mu$ L。循环体系为: 95  $^{\circ}$ C  $\times$  3 min, 95  $^{\circ}$ C  $\times$  12 s, 62  $^{\circ}$ C  $\times$  35 s, 72  $^{\circ}$ C  $\times$  30 s, 共 35 个循环。以 U6 snRNA 为内参,所测定的 miR-26a 的相对表达量采用 2- $\Delta\Delta$ CT 法分析。检测 MTDH mRNA 方法同上,其引物序列正向: 5'-TGGCAAATGTGGCCAACA-3', 反向: 5'-TATTAGGTAACCGACCCCTCTT-3', 以  $\beta$ -actin 为内参,所测定的 MTDH mRNA 的相对表达量采用 2- $\Delta\Delta$ CT 法分析。

### 1.5 Western blot

将 miR-26a mimics 或 MTDH siRNA 质粒转染 CAOV3 细胞,48 h 后提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。各组取等量样本,进行 SDS-PAGE 凝胶

电泳,然后将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% BSA 封闭,加入 MTDH 或 GAPDH 抗体,4  $^{\circ}$ C 过夜。TBST 洗膜 30 min,加入二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 30 min,加入 ECL 发光剂, X 片曝光、显影、定影。

### 1.6 MTT 法检测细胞增殖活性

取转染后的 CAOV3 细胞,消化后接种细胞于 96 孔板中,每空 5 000 个细胞,每组设 6 个复孔,放 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。在未接种细胞的孔中加入 RPMI-1640 培养基中作为调零孔。接种 72 h 后,每孔加 20  $\mu$ L MTS 检测试剂,37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h,用酶标仪测定 492 nm 波长吸光度值 (OD492)。实验重复 3 次。

### 1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。所有结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,癌与癌旁两组间比较采用配对  $t$  检验,其他计量资料采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 卵巢癌及其相应癌旁组织中 miR-26a 表达水平分析

qRT-PCR 结果显示,miR-26a 在 52 例卵巢癌癌旁组织、癌组织中的表达分别为  $1.05 \pm 0.18$ 、 $0.69 \pm 0.16$ , 两者相比,差异有显著性 ( $P < 0.01$ , 图 1A); MTDH 在 52 例卵巢癌癌旁组织、癌组织中的表达分别为  $1.11 \pm 0.21$ 、 $3.49 \pm 0.54$ , 两者相比,差异具有显著性 ( $P < 0.01$ , 图 1B)。

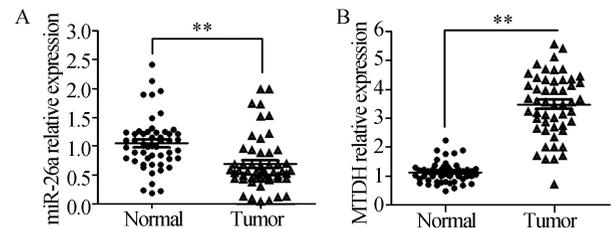


图 1 miR-26a 与 MTDH 在卵巢癌组织和癌旁组织中表达水平的分析 A: miR-26a 表达水平; B: MTDH mRNA 表达水平

\*\*  $P < 0.01$

### 2.2 miR-26a 对卵巢癌 CAOV3 细胞中 MTDH 蛋白表达的影响

研究已表明 MTDH 是 miR-26a 的靶基因<sup>[12]</sup>, 为了明确 miR-26a 对 MTDH 的蛋白质表达的调控作

用,将 miR-26a mimics 转染卵巢癌 CAOV3 细胞,以转染 miR-26a-control 为阴性对照,转染 MTDH siRNA 为阳性对照,转染 48 h 后收集蛋白。Western blot 检测结果显示,转染 miR-26a 组和 MTDH siRNA 组 MTDH 蛋白表达水平较阴性对照组明显降低(图 2)。即 miR-26a 能下调卵巢癌 CAOV3 细胞系中 MTDH 蛋白质的表达。

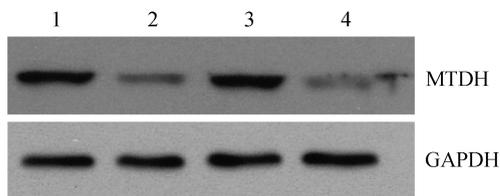


图 2 Western blot 检测 miR-26a 对 MTDH 蛋白的影响  
1:miR-26a-control;2:miR-26a mimics;3:MTDH siRNA-control;4:MTDH siRNA

### 2.3 miR-26a 对卵巢癌细胞增殖能力的影响

分别将 miR-26a-mimics, miR-26a-control (阴性对照组) 和 MTDH siRNA 以及 siRNA-control (阴性对照组) 转入 CAOV3 细胞 24、48、72 h 后,通过 MTT 法检测其对细胞增殖活性的影响。结果显示,转染 MTDH siRNA 和 miR-26a mimics 组 CAOV3 细胞从 48 h 起增殖速度明显减慢,与 miR-26a control 对照组细胞相比,差异均有显著性 ( $P < 0.05$ , 图 3),高表达 miR-26a 通过下调 MTDH 的表达,从而抑制卵巢癌 CAOV3 细胞的生长增殖。

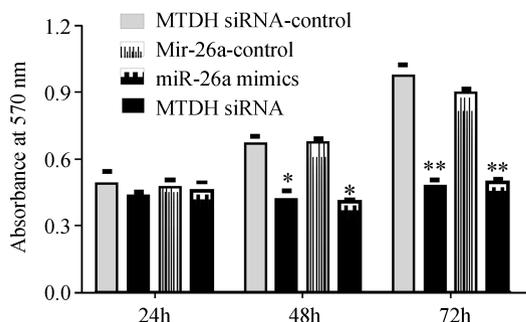


图 3 miR-26a 与 MTDH siRNA 抑制 CAOV3 细胞增殖  
与 MTDH siRNA-control 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

### 2.4 在卵巢癌及其癌旁组织中 miR-26a 与 MTDH 的表达成负相关

经 SPSS 16.0 软件相关性分析发现,在卵巢癌及其癌旁组织中 miR-26a 与 MTDH 的表达成负相

关,相关系数  $r = -0.043$ ,  $P = 0.032$ ,差异具有显著性(图 4)。

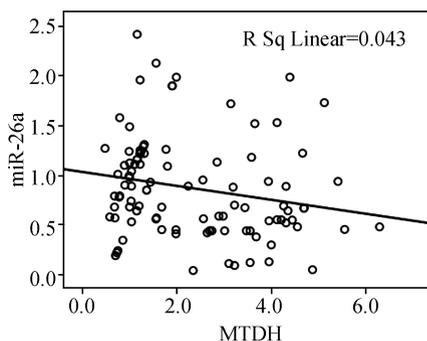


图 4 miR-26a 与 MTDH 在卵巢癌及其癌旁组织中的相关性分析

## 3 讨论

卵巢癌在女性生殖肿瘤中的发病率居第六位,每年大约有 230 000 例新发病例<sup>[13]</sup>。卵巢癌的早期生存率很高,但是由于大多数患者就诊时已是晚期,而且大部分病人对目前的化疗产生耐药,所以化疗药物对卵巢癌患者的治疗成功率很低<sup>[13]</sup>。每年约有 140 000 位患者死于卵巢癌,严重威胁着人民的生命健康<sup>[14]</sup>。这一状况近十年来未能改善,卵巢癌生存率仍然很低,死亡率居各类妇科恶性肿瘤的首位,对妇女生命造成严重威胁,迫切需要新的治疗药物提高卵巢癌的生存率。

miRNA 是长 20-23nt 的非编码 RNA,通过与靶基因 3'-非翻译区完全或不完全互补结合,抑制基因的翻译或降解 mRNA 发挥调控基因表达的功能。目前,有上千的 miRNA 被发现,已证实许多 miRNA 参与了发育、分化、凋亡、增殖及细胞死亡等生物过程并发挥重要作用<sup>[1,15]</sup>。多个 miRNA 在肿瘤中表达失调。其可能的机制有:miRNA 所在基因发生缺失、扩增、转位、转录因子调控、表观遗传调控<sup>[2]</sup>。研究表明,miRNA 在卵巢癌的发生发展中发挥癌基因/抑癌基因的作用,调控肿瘤增殖、浸润、凋亡及耐药性等功能<sup>[16]</sup>。研究表明 miR-26a 在肝癌中下调,其表达水平与肝癌患者生存时间及对干扰素治疗的敏感性相关<sup>[3]</sup>。miR-26a 在鼻咽癌中表达下调且能通过靶基因 EZH2 抑制鼻咽癌细胞生长和致瘤性<sup>[4]</sup>。同时 miR-26a 能明显抑制乳腺癌细胞增殖生长、诱导乳腺癌细胞凋亡<sup>[17]</sup>。然而目前关于 miR-

26a 在卵巢中的研究报道尚少见,本研究通过对卵巢癌和癌旁组织中 miR-26a 的表达检测,发现 miR-26a 在卵巢组织中表达明显下调。研究已表明 MTDH 是 miR-26a 的靶基因,且本研究通过蛋白质印迹试验也进一步证实 MTDH 是 miR-26a 调控的靶基因。MTDH 最初在胎儿胶质细胞瘤中发现,是一个 HIV 诱导的基因,并且作为癌基因参与多种肿瘤的发生发展。研究证实 MTDH 在多种恶性肿瘤中表达上调,并且通过 PI3K-AKT, NF- $\kappa$ B, MAPK 以及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号途径参与肿瘤发生的多种生物学过程<sup>[18]</sup>。本研究还发现在 CAOV3 细胞中过表达 miR-26a 或干扰 MTDH 后能明显抑制 CAOV3 细胞的增殖活力,表明 miR-26a 可能通过下调 MTDH 的表达,从而抑制卵巢癌 CAOV3 细胞的增殖。综上所述,miR-26a 在卵巢癌细胞中表达下调,并通过直接靶向调控 MTDH 的表达发挥生物学作用,本文继续深入 miR-26a 在卵巢癌中的功能和分子研究,系统阐明 miR-26a 参与卵巢癌发生发展的可能分子机制,为卵巢癌的治疗提供了新的治疗靶点。

#### 参考文献:

[1] Tang H, Deng M, Tang Y, et al. miR-200b and miR-200c as prognostic factors and mediators of gastric cancer cell progression [J]. Clin Cancer Res, 2014, 19 (20): 5602-5612.

[2] Tang H, Kong Y, Guo J, et al. Diallyl disulfide suppresses proliferation and induces apoptosis in human gastric cancer through Wnt-1 signaling pathway by up-regulation of miR-200b and miR-22 [J]. Cancer Letters, 2013, 340 (1): 72-81.

[3] Ji J, Shi J, Budhu A, et al. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer [J]. N Engl J Med, 2009, 361 (15): 1437-1447.

[4] Lu J, He ML, Wang L, et al. MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2 [J]. Cancer Res, 2011, 71 (1): 225-233.

[5] Gaedcke J, Grade M, Camps J, et al. The rectal cancer microRNAome-microRNA expression in rectal cancer and matched normal mucosa [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18 (18): 4919-4930.

[6] Yu C, Chen K, Zheng H, et al. Overexpression of astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) is associated with esophageal

squamous cell carcinoma (ESCC) progression and pathogenesis [J]. Carcinogenesis, 2009, 30 (5): 894-901.

- [7] Jian-bo X, Hui W, Yu-long H, et al. Astrocyte-elevated gene-1 overexpression is associated with poor prognosis in gastric cancer [J]. Med Oncol, 2011, 28 (7): 455-462.
- [8] Chen W, Ke Z, Shi H, et al. Overexpression of AEG-1 in renal cell carcinoma and its correlation with tumor nuclear grade and progression [J]. Neoplasma, 2010, 57 (6): 522-529.
- [9] Thirkettle HJ, Girling J, Warren AY, et al. LYRIC/AEG-1 is targeted to different subcellular compartments by ubiquitinylation and intrinsic nuclear localization signals [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15 (9): 3003-3013.
- [10] Song L, Li W, Zhang H, et al. Over-expression of AEG-1 significantly associates with tumour aggressiveness and poor prognosis in human non-small cell lung cancer [J]. J Pathol, 2009, 219 (1): 317-326.
- [11] Li C, Li Y, Wang X, et al. Elevated expression of astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) is correlated with cisplatin-based chemoresistance and shortened outcome in patients with stages III-IV serous ovarian carcinoma [J]. Histopathology, 2012, 60 (6): 953-963.
- [12] Zhang B, Liu XX, He JR, et al. Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer [J]. Carcinogenesis, 2011, 32 (1): 2-9.
- [13] Fung-Kee-Fung M, Oliver T, Elit L, et al. Optimal chemotherapy treatment for women with recurrent ovarian cancer [J]. Curr Oncol, 2007, 14 (4): 195-208.
- [14] Wright JD, Shah M, Mathew L, et al. Fertility preservation in young women with epithelial ovarian cancer [J]. Cancer, 2009, 115 (18): 4118-4126.
- [15] Gao J, Li L, Wu M, et al. MiR-26a Inhibits Proliferation and Migration of Breast Cancer through Repression of MCL-1 [J]. PLoS One, 2013, 8 (12): e651
- [16] Schoof CR, Botelho EL, Izzotti A, et al. MicroRNAs in cancer treatment and prognosis [J]. Am J Cancer Res, 2012, 2 (2): 414-433.
- [17] 凌宏艳, 廖端芳. 微小 RNA 研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (5): 409-412.
- [18] Butowski NA, Sneed PK, Chang SM. Diagnosis and treatment of recurrent high-grade astrocytoma [J]. J Clin Oncol, 2006, 24 (8): 1273-1280.

(此文编辑: 蒋湘莲)