

MiR-130a 在上皮性卵巢癌铂类敏感与耐药患者血清中的表达及相关机制研究*

陈 岑, 王红静[△], 杨凌云, 贾西彪, 徐 盼, 陈 静, 刘 亚

四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041)

【摘要】 目的 分析 miR-130a 在上皮性卵巢癌铂类敏感与耐药患者血清中的表达情况, 探讨其耐药的相关机制。方法 选取 32 例上皮性卵巢癌铂类化疗耐药患者及 30 例化疗敏感患者, 采用实时荧光定量 PCR 检测受试者血清中 miR-130a 表达差异, ELISA 法检测血清中人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, *PTEN*)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, *BCL-2*)表达情况。结果 耐药组患者血清 miR-130a 和 *BCL-2* 表达均高于敏感组, 而 *PTEN* 表达低于敏感组(P 均 <0.05)。且随着组织学分级增加及淋巴转移的发生, 耐药组患者血清 miR-130a 表达量显著升高($P<0.05$)。结论 MiR-130a 可能通过抑制 *PTEN* 激活 PI3K/AKT 信号通路、上调 *BCL-2* 抑制肿瘤细胞凋亡参与上皮性卵巢癌铂类化疗耐药的产生, miR-130a 有望成为逆转上皮性卵巢癌铂类化疗耐药的基因治疗新靶点。

【关键词】 卵巢癌 铂类耐药 miR-130a 机制

Expression of MiR-130a in Serum Samples of Patients with Epithelial Ovarian Cancer and Its Association with Platinum Resistance CHEN Cen, WANG Hong-jing[△], YANG Ling-yun, JIA Xi-biao, XU Pan, CHEN Jing, LIU Ya. Department of Gynecology and Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: whjcdx@163.com

【Abstract】 Objective To determine the expression of miR-130a in patients with epithelial ovarian cancer and its association with platinum resistance. **Methods** 32 patients with platinum resistance and 30 patients without platinum resistance were recruited in this study. Real-time PCR was performed to detect the expression of miR-130a in the serum samples of the patients. ELISA was used to measure the expression level of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (*PTEN*) and B-cell lymphoma-2 (*BCL-2*). **Results** Platinum-resistant patients had significantly higher levels of expression of miR-130a and *BCL-2*, and lower level of *PTEN* than platinum-sensitive patients ($P<0.05$). The expression level of miR-130a increased with increased severity in histological classification and appearance of lymph node metastasis in the platinum-resistant patients ($P<0.05$). **Conclusion** MiR-130a may mediate the generation of platinum resistance in epithelial ovarian cancer through inhibiting *PTEN* to activate PI3K/AKT signaling pathway and increasing *BCL-2* to inhibit tumor cell apoptosis. MiR-130a may be a new potential target of gene therapy in platinum-resistant ovarian cancers.

【Key words】 Ovarian cancer Platinum resistance MiR-130a Mechanism

卵巢癌作为妇科三大恶性肿瘤之一, 70%~80% 患者首次发现时已属中晚期, 晚期患者生存率仅有 10%~30%, 严重威胁广大妇女的身体健康^[1,2]。早期患者可行全面分期手术, 晚期患者行肿瘤细胞减灭术, 联合以铂类为基础的化疗方案是其治疗的主要方式。化疗耐药性的产生严重影响卵巢癌综合治疗效果, 其复发转移率高达 85%~90%, 5 年生存率不足 30%^[3,4]。因此逆转化疗耐药性是现阶段卵巢癌治疗的关键问题。近年来国内外

大量研究发现, miRNA 可通过靶向调控癌症相关基因从而影响肿瘤的发生、凋亡及化疗耐药。本课题组前期研究中通过基因芯片及 PCR 技术比较卵巢癌顺铂敏感与耐药细胞株(A2780 vs. A2780/CIS, SKOV3 vs. SKOV3/CIS)中 miRNA 表达差异发现, miR-130a 在 A2780/CIS 与 SKOV3/CIS 中显著高表达, 且软件预测人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(*PTEN*)是 miR-130a 作用的靶基因, 可能通过 PI3K/AKT 信号通路调控上皮性卵巢癌顺铂耐药^[5,6]。近年研究显示肿瘤相关 miRNA 可在血清中稳定检测到^[7], 且较组织取材更为方便, 因此检测血液中肿瘤相关特异性

* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2012SZ0022)资助

[△] 通讯作者, E-mail: whjcdx@163.com

miRNA 对于肿瘤早期诊断及判断预后具有重要意义。本研究拟在前期实验的基础上进一步检测上皮性卵巢癌铂类敏感与耐药患者血清中 miR-130a 表达差异,并根据前期软件预测结果,检测两组患者血清 PTEN 和 PI3K/AKT 信号通路下游抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(BCL-2)的表达,探讨其相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 标本取自 2012 年 10 月至 2013 年 9 月在四川大学华西第二医院进行的上皮性卵巢癌患者共 62 例,所有患者手术前均未行放疗或其他生物学治疗,手术方式为肿瘤细胞减灭术,标本术后均经病理证实,并采用以铂类为基础的化疗。其中浆液性腺癌 34 例,黏液性腺癌 13 例,透明细胞癌 5 例,子宫内膜样癌 3 例,混合性癌 7 例。NCCN 指南(2013 年)中关于上皮性卵巢癌铂类化疗耐药与敏感的定义为:初始化疗完全缓解,停止化疗后 < 6 个月复发为铂类耐药;初始化疗完全缓解,停止化疗后 > 6 个月复发为铂类敏感。根据以上定义,62 例患者中 32 例为铂类耐药(耐药组),30 例为铂类敏感(敏感组)。耐药组患者年龄 35~72 岁,平均年龄(51.32±9.11)岁,敏感组患者年龄 32~73 岁,平均年龄(51.47±9.03)岁,两组年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.1.2 材料试剂 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),紫外分光光度计(NanoDrop[®] ND-1000),miR-130a real-time PCR 引物(上海百力格生物技术有限公司),hsa-miR-93-5p real-time PCR 引物(上海百力格生物技术有限公司),ViiA 7 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司),PTEN 蛋白 ELISA 试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司),BCL-2 蛋白 ELISA 试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 血清采集 抽取以上患者手臂静脉血 5 mL 左右,置于加入分离胶的促凝采血管中,4 °C 下 3 000 r/min 的速度离心 10 min,移取上层血清分装入洁净 EP 管后做好标记放入 -80 °C 冰箱保存。

1.2.2 血清 RNA 提取及检测 按照 Trizol 试剂说明书中的 RNA Isolation Procedure 提取血清总 RNA。分光光度计检测 RNA 提取液光密度 OD_{260/280}、OD_{260/230} 比值,OD_{260/280} 值应在 1.8~2.1

之间,OD_{260/230} 值应 > 1.8。

1.2.3 cDNA 合成 取 100 ng RNA 进行逆转录,20 μL 反应体系如下:dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL,10×缓冲液 2 μL,RT 特异引物(1 μmol/L) 0.3 μL,MMLV 反转录酶(200 U/μL) 0.1 μL,RNA 酶抑制剂(40 U/μL) 0.3 μL,无 RNA 酶水补至 20 μL。反应条件为:16 °C 30 min,42 °C 40 min,85 °C 5 min,反应结束后,放在冰上待用或 -20 °C 保存。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 miR-130a 表达 设计相应的 PCR 引物序列,以 hsa-miR-93-5p 为内参进行标准化,采用 ViiA 7 Real-time PCR System 进行 PCR 扩增。反应体系总体积为 10 μL,其中 2×Master Mix 5 μL,miR-130a PCR 特异引物 F(10 μmol/L) 0.5 μL,miR-130a PCR 特异引物 R(10 μmol/L) 0.5 μL,Rnase-free H₂O 2 μL,cDNA 2 μL。PCR 引物序列见表 1。PCR 循环条件为:95 °C,10 min;40 个 PCR 循环 95 °C 10 s,60 °C 60 s。为了建立 PCR 产物的熔解曲线,扩增反应结束后,按(95 °C 10 s,60 °C 60 s,95 °C 15 s),并从 60 °C 缓慢加热到 99 °C。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算患者血清中 miR-130a 的相对表达量。样品目的基因相对表达量(RQ) = 2^{-ΔΔCt} (ΔCt = Ct_{miR-130a} - Ct_{hsa-miR-93-5p}, ΔΔCt = ΔCt_{耐药组} - ΔCt_{敏感组})。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of real-time PCR

Primer	Sequence
MiR-130a	F:5'-GGGGCAGTGCAATGTTAAAA-3' R:5'-GTGCGTGTCTGGAGTTCG-3'
Hsa-miR-93-5p	F:5'-GGGCAAAGTCTGTTCTCGTG-3' R:5'-CAGTGCGTGTCTGGAGT-3'

1.2.5 ELISA 法检测卵巢癌患者血清中 PTEN、BCL-2 浓度 严格按照试剂盒说明书进行操作,分别设空白孔、标准品孔、待测样品孔。在酶标包被板上空白孔加样品稀释液 100 μL,余孔分别加标准品或待测样品 100 μL,封板后置 37 °C 温育 2 h;弃去液体,甩干,不用洗涤;每孔加检测试剂 A 100 μL 37 °C 温育 1 h,弃去孔内液体,洗板 3 次,洗涤液 350 μL/孔,每次浸泡 1~2 min,用吸水纸吸干;每孔加检测试剂 B 100 μL 37 °C 温育 30 min,弃去孔内液体,洗板 5 次,洗涤液 350 μL/孔,每次浸泡 1~2 min,用吸水纸吸干;每孔加底物溶液 90 μL,37 °C 避光显色(15~25 min 左右,不能超过 30 min,此时肉眼可见孔内液体梯度性变蓝);每孔加入终止液

50 μ L 终止反应(此时蓝色立转黄色);450 nm 波长依序测量各孔的 OD 值。

1.3 统计学方法

以上实验重复 3 遍,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用方差分析或 χ^2 检验比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 铂类耐药组和敏感组患者的临床病理特征

两组患者在 FIGO 分期、病理类型、组织学分级、淋巴转移及脉管浸润等临床病理特征间差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),见表 2。

表 2 铂类耐药与敏感患者临床病理特征[例数(%)]

Table 2 Clinicopathological characteristics of patients with platinum sensitivity and resistance [case (%)]

	Resistant patients ($n=32$)	Sensitive patients ($n=30$)	P
FIGO stage			0.17
I-II	12 (37.50)	9 (30.00)	
III-IV	20 (62.50)	21 (70.00)	
Pathological type			0.38
Serous adenocarcinoma	18 (56.25)	16 (53.33)	
Mucinous adenocarcinoma	7 (21.88)	6 (20.00)	
Clear cell carcinoma	2 (6.25)	3 (10.00)	
Endometrioid carcinoma	2 (6.25)	1 (3.33)	
Mixed carcinoma	3 (9.38)	4 (13.33)	
Histological classification			0.28
G1-G2	11 (34.38)	11 (36.67)	
G3	21 (65.63)	19 (63.33)	
Lymph node metastasis			0.14
Yes	19 (59.38)	16 (53.33)	
No	13 (40.63)	14 (46.67)	
Vascular invasion			0.42
Yes	22 (68.75)	19 (63.33)	
No	10 (31.25)	11 (36.67)	

2.2 MiR-130a、PTEN、BCL-2 在两组患者血清中的表达情况

耐药组患者血清 miR-130a 表达量及 BCL-2 蛋白表达高于敏感组($P < 0.05$),PTEN 蛋白表达低于敏感组($P < 0.05$),见表 3。

表 3 MiR-130a、PTEN、BCL-2 在耐药与敏感组患者血清中的相对表达量

Table 3 Relative expression of miR-130a, PTEN, BCL-2 in serum samples of patients

Group	n	MiR-130a ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	PTEN (OD ₄₅₀ value)	BCL-2 (OD ₄₅₀ value)
Platinum resistant	32	4.21 \pm 0.98	6.26 \pm 4.29	11.36 \pm 4.22
Platinum sensitive	30	1.70 \pm 0.68*	20.18 \pm 4.02*	2.11 \pm 0.98*

* $P < 0.05$, vs. platinum resistant group

2.3 耐药组组内不同病理特征患者血清中 miR-130a 表达水平比较

耐药组患者血清 miR-130a 表达水平在 I ~ II 期与 III ~ IV 期、不同病理类型、以及有或无脉管癌栓浸润方面比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。而组织学分级 G1 ~ G2 患者血清 miR-130a 表达低于 G3,有淋巴转移患者 miR-130a 表达高于无淋巴转移者(P 均 < 0.05),见表 4。

表 4 耐药组组内不同病理特征患者血清中 miR-130a 的表达水平
Table 4 The serum expression level of miR-130a in platinum resistant patients with different pathological characteristics

	n	MiR-130a expression level	P
FIGO stage			0.17
I-II	12	3.92 \pm 0.65	
III-IV	20	4.13 \pm 0.15	
Pathological type			0.43
Serous adenocarcinoma	18	4.24 \pm 0.12	
Mucinous adenocarcinoma	7	3.91 \pm 0.82	
Other types	7	4.13 \pm 0.32	
Histological classification			0.03
G1-G2	11	3.43 \pm 0.52	
G3	21	4.23 \pm 0.68	
Lymph node metastasis			0.04
Yes	19	4.31 \pm 0.72	
No	13	3.21 \pm 0.47	
Vascular invasion			0.73
Yes	22	4.11 \pm 0.32	
No	10	4.16 \pm 0.67	

3 讨论

MiRNA 是小分子非编码单链 RNA,参与生物体细胞分化、发育、增殖、凋亡及免疫等多种生物学过程,近年来 miRNA 已成为生命科学及医学领域的研究热点。Corney 等^[8]研究发现,miR-21 上调能抑制卵巢癌细胞凋亡,从而导致肿瘤生长及化疗耐药。Fu 等^[9]应用 miRNA 芯片技术及 PCR 检测卵巢癌细胞株发现,顺铂耐药细胞株中 miR-93 表达上调,敏感细胞株中则相反,且 PTEN 为 miR-93 作用靶基因。Xia 等^[10]在对肝癌的研究中发现,高表达的 miR-216a/217 能通过作用于 PTEN 及 SMAD7 激活 PI3K/AKT、TGF- β 信号通路,从而导致肝癌耐药发生及肿瘤复发。Rao 等^[11]发现套细胞淋巴瘤中 miR-17 ~ 92 升高能通过激活 PI3K/AKT 信号通路抑制化疗导致的肿瘤细胞凋亡,当降低相应的 miRNA 表达后可抑制此通路而使小鼠模型中肿瘤体积减小,提示 miRNA 可能通过参与调控信号通路而导致肿瘤耐药的产生。随着越来越多

的肿瘤耐药与 miRNA 家族关系的揭示,使逆转肿瘤化疗耐药及提高肿瘤患者生存率成为了可能。

临床医师通常通过停用铂类药物的时间与肿瘤复发时间的关系来判断患者是否化疗耐药,无法在化疗前筛查出耐药患者,因此在制定化疗方案前具有一定未知性。Chao 等^[12]研究发现 miR-130a 在复发性卵巢透明细胞癌中高表达,可作为检测肿瘤早期复发的血清标志物。由此推测检测上皮性卵巢癌铂类化疗耐药与敏感患者血清中 miR-130a 表达,并探讨其作用机制,具有重要临床意义。

为验证前期研究^[5,6]结果,我们在体外细胞系研究的基础上进一步检测上皮性卵巢癌铂类耐药与敏感患者血清中 miR-130a 表达差异,并探讨相关作用机制。结果发现上皮性卵巢癌铂类耐药与敏感患者在年龄、FIGO 分期、病理类型、组织学分级、淋巴转移及脉管浸润等临床病理特征间差异均无统计学意义。耐药组患者血清中 miR-130a 表达高于敏感组,与前期卵巢癌细胞株实验结论一致,耐药组患者血清 PTEN 表达低于敏感组,而 BCL-2 表达则高于敏感组,提示 miR-130a 与上皮性卵巢癌铂类化疗耐药的发生有关。作为 miR-130a 的靶基因,PTEN 可抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和转移,促进细胞凋亡,并通过磷酸酶活性使 PIP3 脱磷酸呈低水平表达,而 PIP3 可作为 PI3K/AKT 信号通路中 PI3K 第二信使,且介导 AKT 活化(p-AKT 生成),即 PTEN 升高抑制了 PI3K/AKT 信号通路^[13]。我们推测 miR-130a 可能通过抑制 PTEN 激活 PI3K/AKT 信号通路,上调 BCL-2 抑制肿瘤细胞凋亡参与上皮性卵巢癌铂类化疗耐药。对耐药组患者临床病理特征进一步研究发现,组织学分级 G1~G2 患者血清 miR-130a 表达低于 G3,有淋巴转移者患者 miR-130a 表达高于无淋巴转移者,提示 miR-130a 表达可能与上皮性卵巢癌铂类化疗耐药程度有关,值得进一步研究。

综上所述,miR-130a 在上皮性卵巢癌铂类化疗耐药组患者血清中高表达,且其表达量与组织学分级和淋巴转移相关,有望成为早期预测上皮性卵巢癌铂类化疗耐药的血清标志物及逆转化疗耐药的基因治疗新靶点。可在此基础上进一步扩大实验样本数量深入研究,为耐药性卵巢癌的诊断和基因治疗

提供理论依据。

参 考 文 献

- 曹泽毅. 中华妇产科学. 第 2 版(下册). 北京:人民卫生出版社,2005:2153-2271.
- Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *Lancet*,2009;374(9698):1371-1382.
- Muggia F. Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: implications for the treatment of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*,2009;112(1):275-281.
- Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*,2007;33(1):9-23.
- Yang L, Li N, Wang H, *et al.* Altered microRNA expression in cisplatin-resistant ovarian cancer cells and upregulation of miR-130a associated with MDR1/P-glycoprotein-mediated drug resistance. *Oncol Rep*,2012;28(2):592-600.
- 杨凌云,王红静,贾西彪等. miR-130a 在卵巢癌顺铂耐药细胞株中的表达及其意义. *四川大学学报(医学版)*,2012;43(1):60-64.
- Chen X, Ba Y, Ma L, *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*,2008;18(10):997-1006.
- Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, *et al.* MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res*,2007;67(18):8433-8438.
- Fu X, Tian J, Zhang L, *et al.* Involvement of microRNA-93, a new regulator of PTEN/Akt signaling pathway, in regulation of chemotherapeutic drug cisplatin chemosensitivity in ovarian cancer cells. *FEBS Lett*,2012;586(9):1279-1286.
- Xia H, Ooi LL, Hui KM. MicroRNA-216a/217-induced epithelial-mesenchymal transition targets PTEN and SMAD7 to promote drug resistance and recurrence of liver cancer. *Hepatology*,2013;58(2):629-641.
- Rao E, Jiang C, Ji M, *et al.* The miRNA-17 approximately 92 cluster mediates chemoresistance and enhances tumor growth in mantle cell lymphoma via PI3K/AKT pathway activation. *Leukemia*,2012;26(5):1064-1072.
- Chao A, Lai CH, Chen HC, *et al.* Serum microRNAs in clear cell carcinoma of the ovary. *Taiwan J Obstet Gynecol*,2014;53(4):536-541.
- Carracedo A, Alimonti A, Pandolfi PP. PTEN level in tumor suppression: how much is too little? *Cancer Res*,2011;71(3):629-633.

(2015-03-17 收稿,2015-07-12 修回)

编辑 吕 熙