

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.10.002

## 微小 RNA-134-5p 靶向作用于 EGFR 对卵巢癌 SKOV3 和 A2780 细胞生长的影响\*

汤继英<sup>1,2</sup>, 陈萍<sup>1△</sup>, 蔡晓军<sup>1</sup>, 汪选斌<sup>1,2</sup>, 曹风军<sup>1</sup>, 张莉<sup>1</sup>

(湖北医药学院附属人民医院:1. 肿瘤中心;2. 中药药理实验室, 湖北十堰 442000)

**[摘要]** **目的** 探讨微小 RNA-134-5p(miR-134-5p)靶向作用于表皮生长因子受体(EGFR)基因对卵巢癌细胞生长的影响。**方法** 以卵巢癌细胞系 SKOV3 和 A2780 为研究对象,根据处理方法分为对照组(转染 miR-NC)和实验组(转染 miR-134-5p)。采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 EGFR 基因及下游靶蛋白的表达量;流式细胞术检测细胞周期分布和细胞凋亡情况;四甲基偶氮唑蓝(MTT)法和集落形成实验检测卵巢癌细胞增殖能力。**结果** 实验组 EGFR 基因及下游靶蛋白表达显著下调,其中 SKOV3 细胞中 EGFR mRNA 下调至 48%( $P<0.05$ ),A2780 细胞中 EGFR mRNA 下调至 47%( $P<0.05$ )。实验组细胞的细胞周期明显受到抑制( $P<0.05$ ),miR-134-5p 通过 EGFR 靶蛋白诱导细胞凋亡( $P<0.05$ )。实验组细胞的增殖活性和集落形成能力明显受到抑制( $P<0.05$ )。**结论** miR-134-5p 可通过靶向抑制 EGFR 基因,促进细胞周期停滞和细胞凋亡,降低卵巢癌细胞的增殖能力。

**[关键词]** 微 RNAs;卵巢肿瘤;基因,肿瘤抑制;受体,表皮生长因子;SKOV3;A2780

**[中图分类号]** R736.8

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2018)10-1301-04

### Effect of microRNA-134-5p targeting EGFR on growth of ovarian cancer SKOV3 and A2780 cells\*

TANG Jiying<sup>1,2</sup>, CHEN Ping<sup>1△</sup>, CAI Xiaojun<sup>1</sup>, WANG Xuanbin<sup>1,2</sup>, CAO Fengjun<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>

(1. Tumor Center;2. Laboratory of Chinese Herbal Pharmacology, Affiliated People's Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of microRNA-134-5p (miR-134-5p) targeting epidermal growth factor receptor (EGFR) on the growth of ovarian cancer cells. **Methods** The ovarian cancer cell lines SKOV3 and A2780 served as the study objects and were divided into the control group (transfecting miR-NC) and experimental group (transfecting miR-134-5p) according to the treatment method. The expression levels of EGFR gene and downstream target protein were detected by qRT-PCR and western blot. The cell cycle distribution and apoptosis were detected by flow cytometry. The proliferation ability of ovarian cancer cells was detected by MTT assay and colony forming assay. **Results** The expressions of EGFR and downstream target protein in the experimental group were significantly down-regulated. EGFR mRNA in SKOV3 cells was down-regulated to 48% ( $P<0.05$ ), and EGFR mRNA in A2780 cells was down-regulated to 47% ( $P<0.05$ ). The cell cycle of cells in the experimental group was significantly inhibited ( $P<0.05$ ), and miR-134-5p induced apoptosis through the EGFR target protein ( $P<0.05$ ). The proliferation activity and colony forming ability of the experimental group were significantly inhibited ( $P<0.05$ ). **Conclusion** miR-134-5p could promote the cellular cycle arrest and apoptosis, and reduces the proliferation ability of ovarian cancer cells by targetedly inhibiting the EGFR gene.

**[Key words]** microRNAs; ovarian neoplasms; genes, tumor suppressor; receptor, epidermal growth factor; SKOV3; A2780

表皮生长因子受体(EGFR)信号通路的活化可促进肿瘤细胞周期进展,抑制细胞的凋亡,增强细胞的增殖能力,参与肿瘤的发生、发展<sup>[1-3]</sup>。有研究表明,miR-134-5p 在肺癌中可显著干扰 EGFR 基因的表达<sup>[4]</sup>。然而 miR-134-5p 在卵巢癌细胞中对 EGFR 信

号通路的影响尚未阐明。本研究通过转染 miR-134-5p,观察卵巢癌细胞中 EGFR 信号通路的表达情况及卵巢癌细胞生物学行为的变化。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 卵巢癌细胞系 SKOV3 和 A2780(中国科

学院上海生命科学研究院细胞资源中心); miR-134-5p 模拟物(mimics), miR-NC(上海吉凯基因化学技术有限公司合成); DMEM 高糖培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司); lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司); qRT-PCR 相关试剂(日本 TaKaRa 公司); 引物(上海生物工程股份有限公司, 表 1); 本实验所用抗体均购自美国 CST 公司; 四甲基偶氮唑蓝(MTT, 美国 Sigma 公司); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(上海鑫乐生物科技有限公司)。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列 (5'-3')	长度(bp)
GAPDH		101
上游引物	CTGGGCTACACTGAGCACC	19
下游引物	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	21
EGFR		177
上游引物	AGGCACGAGTAACAAGCTCAC	21
下游引物	ATGAGGACATAACCAGCCACC	21

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及转染** 卵巢癌细胞系 SKOV3 和 A2780 贴壁生长于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中。培养条件为: 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度。对照组转染 miR-NC, 实验组转染 miR-134-5p mimics, 具体操作步骤参考 lipofectamine 2000 转染说明书。

**1.2.2 qRT-PCR 检测** 收集细胞, 依据 TaKaRa 试剂盒说明书建立反应体系及参数, 以 GAPDH 为内参, 进行 qRT-PCR, 检测两组细胞中 EGFR 基因的表达, 最终 Ct 值均以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 分析。

**1.2.3 Western blot 检测 miR-143 下游靶基因表达** 转染 48 h 后, 收集各组细胞进行细胞裂解提取总蛋白, 行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离蛋白, 并转移至硝酸纤维膜上, 分别孵育一抗、二抗, 发光剂显影。

**1.2.4 细胞周期实验** 转染 48 h 后, 0.25% 胰酶消化收集细胞; 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次, 弃上清液, 加入 70% 乙醇在 4 °C 下固定 12 h; 离心收集细胞, PBS 洗 2 次, 加入含 RNA 酶的 PI 染液 400 μL 避光染色 1 h, 流式细胞仪上机检测。

**1.2.5 细胞凋亡实验** 转染实验后 48 h, 使用胰酶消化收集细胞, 按照 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作, 流式细胞仪检测。

**1.2.6 MTT 法检测细胞增殖** 将转染 24 h 后的细胞按 4 000/孔加入 96 孔细胞培养板, 分别于第 1、2、3、4、5 天, 每孔加 MTT 20 μL, 培养箱内孵育 4 h, 小心吸去培养液。每孔加二甲基亚砷 150 μL, 振荡 10 min, 使结晶充分溶解。在酶标仪波长 490 nm 处测定光密度(OD)值。

**1.2.7 集落形成实验** 瞬转后 24 h, 胰酶消化收集细胞, 并计数。6 孔板中加入细胞 1 000 /孔, 摇晃均匀, 细胞培养箱内连续培养 10 d 左右。10 d 后观察集落形成情况, 并使用结晶紫染色法固定染色细胞, 拍照、分析。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料用率表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ , 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-134-5p 与 EGFR mRNA 结合位点** miR-134-5p 结合于 EGFR mRNA 的 3'UTR(图 1), mirSVR 评分为 -1.0627, PhastCons 评分为 0.5561。

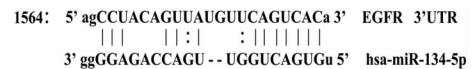
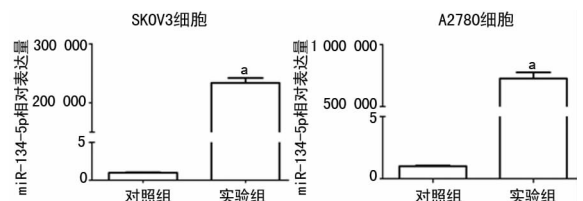


图 1 miR-134-5p 与 EGFR mRNA 3'UTR 结合位点

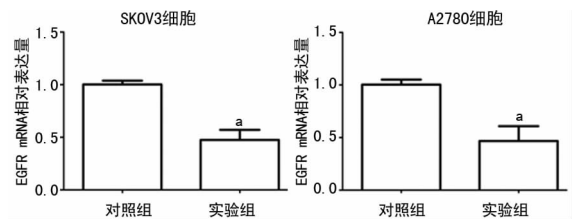
**2.2 miR-134-5p 转染效率检测** qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比, 实验组中 miR-134-5p 的表达明显上升( $P < 0.01$ ), 见图 2。



a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较

图 2 qRT-PCR 检测各组卵巢癌细胞中 miR-134-5p 的表达

**2.3 各组细胞中 EGFR 基因 mRNA 及蛋白表达** qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比, 实验组 SKOV3 细胞中 EGFR mRNA 下调至 48% ( $P < 0.05$ ), A2780 细胞中 EGFR mRNA 下调至 47% ( $P < 0.05$ ) (图 3)。Western blot 结果显示, 与对照组相比, 实验组中 EGFR 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。



a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

图 3 qRT-PCR 检测各组卵巢癌细胞中 EGFR mRNA 的表达

**2.4 EGFR 下游靶蛋白表达** Western blot 结果显示, 与对照组相比, 转染 miR-134-5p 后的卵巢癌细胞中, EGFR 信号通路中的磷酸化表皮生长因子受体(p-EGFR)、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-ERK1/2)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)蛋白的表达明显下调 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

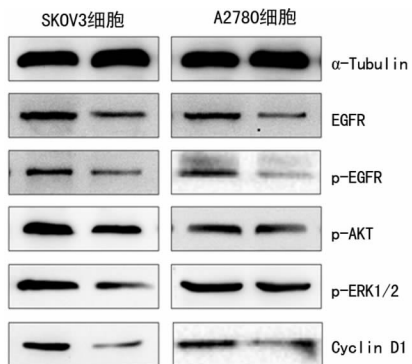


图 4 Western blot 检测两组卵巢癌细胞中蛋白的表达

**2.5 卵巢癌细胞周期和细胞凋亡** 流式细胞术检测显示,与对照组相比,实验组中 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞明显增多,G<sub>2</sub>/M 期细胞明显减少,A2780 细胞 S 期细胞明显减少( $P < 0.05$ ),而 SKOV3 细胞 S 期细胞比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(表 2)。实验组较对照组凋亡明显增多,比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 3。

表 2 两组卵巢癌细胞的细胞周期结果比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

细胞	组别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
SKOV3	对照组	44.43 ± 7.15	34.41 ± 7.31	21.16 ± 4.45
	实验组	65.23 ± 6.30 <sup>a</sup>	24.95 ± 3.34	9.82 ± 4.39 <sup>a</sup>
A2780	对照组	45.98 ± 6.46	28.75 ± 4.11	25.27 ± 5.81
	实验组	63.86 ± 5.81 <sup>a</sup>	20.93 ± 2.74 <sup>a</sup>	15.21 ± 5.42 <sup>a</sup>

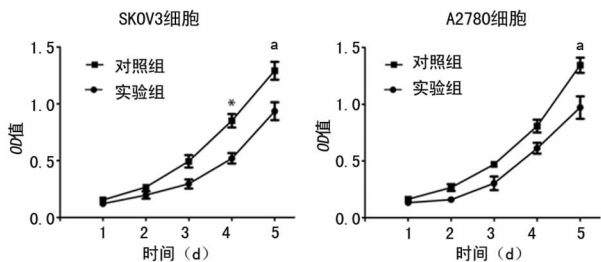
<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与对照组比较

表 3 两组卵巢癌细胞的凋亡率、集落形成能力结果比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

细胞	组别	细胞凋亡率	集落形成率
SKOV3	对照组	3.31 ± 1.25	1.50 ± 0.62
	实验组	22.04 ± 6.07 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.25 <sup>a</sup>
A2780	对照组	4.06 ± 1.21	1.41 ± 0.26
	实验组	18.10 ± 4.00 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.15 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与对照组比较

**2.6 转染 miR-134-5p 后细胞增殖能力** MTT 结果表明,与对照组相比,实验组 SKOV3 细胞在第 4、5 天细胞生长明显受到抑制,A2780 细胞在第 5 天的生长抑制有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 5。



<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与对照组比较

图 5 两组卵巢癌细胞的增殖能力比较

**2.7 转染 miR-134-5p 后细胞集落形成能力** 与对

照组相比,实验组的集落少而小,比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3,集落形成见图 6。

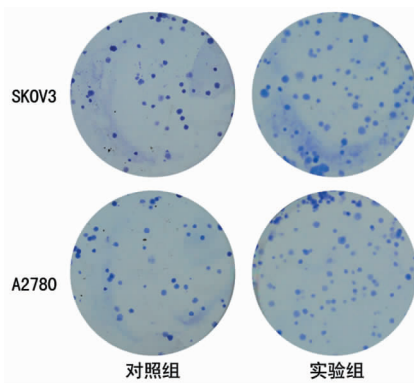


图 6 两组卵巢癌细胞形成的集落图

### 3 讨论

EGFR 属于 1 型酪氨酸激酶 ErbB 家族,是一种重要的跨膜受体<sup>[5-6]</sup>。EGFR 可介导细胞的增殖、分化及凋亡,且 EGFR 的过表达或异常活化与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[7]</sup>。p-EGFR 是 EGFR 的活性形式,p-EGFR 可通过激活下游靶蛋白 p-AKT、p-ERK1/2 和 Cyclin D1 的表达,促进肿瘤细胞的增殖、抑制肿瘤细胞的凋亡<sup>[8]</sup>。RNA 干扰是指内源性 miRNA 或外源性 dsRNA 通过与细胞内的酶如解旋酶、内切酶、外切酶等结合形成 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)。RISC 在转录后水平与靶基因 mRNA 结合,特异性切割降解 mRNA,从而达到干扰靶基因表达的作用<sup>[9]</sup>。miRNAs 是一类内源性非编码 RNA 分子,长度为 19~25 个核苷酸,主要在转录后水平发挥调控作用,参与细胞的增殖、分化、衰老、凋亡等多种功能变化,与各种肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[10]</sup>。miR-134-5p 在多种肿瘤的发生、发展中发挥重要作用,抑制多种肿瘤如结直肠癌、肝癌、肾癌、乳腺癌等细胞的增殖能力或迁移、侵袭能力<sup>[11-13]</sup>。有研究表明,肺癌细胞中 miR-134-5p 可干扰 EGFR 基因的表达<sup>[4]</sup>;那么 miR-134-5p 在卵巢癌中是否同样能够干扰 EGFR 通路的活化,有待进一步研究。

本研究通过 Western blot 实验发现,转染 miR-134-5p 后,卵巢癌细胞中 EGFR、p-EGFR 及下游靶蛋白 p-AKT、p-ERK1/2 和 Cyclin D1 的表达明显下调。p-AKT 和 p-ERK1/2 异常高表达与肿瘤的形成密切相关<sup>[14]</sup>。Cyclin D1 是细胞增殖周期中的启动因子,通过与 CDK4 或 CDK6 结合形成复合物,促进细胞越过 G1 调控点<sup>[15]</sup>。本课题组下一步将构建稳定表达 miR-134-5p 的病毒载体,通过裸鼠荷瘤实验观察 miR-134-5p 在体内对卵巢癌生长的影响。转录激活因子-5b(STAT5b)是信号转导及转录激活因子的一种,STAT5b 的持续或高表达与多种恶性肿瘤的增殖、迁移和侵袭能力密切相关<sup>[16]</sup>。有研究表明,STAT5b 在卵巢癌组织中呈现高表达<sup>[17]</sup>。本研究通

过 miRNA 靶基因预测网站 microRNA. org、TargetScan 和 miRecords 发现 STAT5b 是 miR-134-5p 的靶基因, miR-134-5p 是否能通过靶向作用于 STAT5b 发挥抑癌作用值得研究。

本研究表明, miR-134-5p 可通过靶向作用于 EGFR 基因的表达, 沉默 EGFR 信号通路的活化, 显著抑制卵巢癌细胞的增殖。miR-134-5p 干扰 EGFR 基因表达的机制研究在未来可能为卵巢癌及其他相关疾病提供一个新型的治疗手段。

## 参考文献

- [1] MOHYELDIN M M, AKL M R, SIDDIQUE A B, et al. The marine-derived pachycladin diterpenoids as novel inhibitors of wild-type and mutant EGFR [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017(126): 51-68.
- [2] MARTINELLI E, MORGILLO F, TROIANI T, et al. Cancer resistance to therapies against the EGFR-RAS-RAF pathway: the role of MEK [J]. *Cancer Treat Rev*, 2017(53): 61-69.
- [3] YANG Q S, JIANG L P, HE C Y, et al. Up-regulation of microRNA-133a inhibits the MEK/ERK signaling pathway to promote cell apoptosis and enhance radio-sensitivity by targeting EGFR in esophageal cancer in vivo and in vitro [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(9): 2625-2634.
- [4] QIN Q, WEI F R, ZHANG J B, et al. miR-134 inhibits non-small cell lung cancer growth by targeting the epidermal growth factor receptor [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(10): 1974-1983.
- [5] TSIAMBAS E, LEFAS A Y, GEORGIANNOS S N, et al. EGFR gene deregulation mechanisms in lung adenocarcinoma: a molecular review [J]. *Pathol Res Pract*, 2016, 212(8): 672-677.
- [6] SINGH D, ATTRI B K, GILL R K, et al. Review on EGFR inhibitors: critical updates [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16(14): 1134-1166.
- [7] MENG F, WANG F, WANG L, et al. MiR-30a-5p overexpression may overcome EGFR-inhibitor resistance through regulating PI3K/AKT signaling pathway in non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Front Genet*, 2016(7): 197.
- [8] JEDLINSKI A, GARVIN S, JOHANSSON A C, et al.

Cetuximab sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma xenografts is associated with treatment-induced reduction in EGFR, pEGFR, and pSrc [J]. *J Oral Pathol Med*, 2017, 46(9): 717-724.

- [9] SVOBODA P. Renaissance of mammalian endogenous RNAi [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(15): 2550-2556.
- [10] LOGAN M, HAWKINS S M. Role of microRNAs in cancers of the female reproductive tract: insights from recent clinical and experimental discovery studies [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 128(3): 153-180.
- [11] KLIMCZAK-BITNER A A, KORDEK R, BITNER J, et al. Expression of MMP9, SERPINE1 and miR-134 as prognostic factors in esophageal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 4133-4138.
- [12] ZHA R, GUO W, ZHANG Z, et al. Genome-wide screening identified that miR-134 acts as a metastasis suppressor by targeting integrin  $\beta 1$  in hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87665.
- [13] LIU Y, ZHANG M, QIAN J, et al. miR-134 functions as a tumor suppressor in cell proliferation and epithelial-to-mesenchymal transition by targeting KRAS in renal cell carcinoma cells [J]. *DNA Cell Biol*, 2015, 34(6): 429-436.
- [14] LIU H, MOROI Y, YASUMOTO S, et al. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor, p-AKT and p-ERK1/2 protein in extramammary Paget's disease [J]. *Br J Dermatol*, 2006, 155(3): 586-591.
- [15] GIOACCHINI F M, ALICANDRI-CIUFELLI M, KALECI S, et al. The prognostic value of cyclin D1 expression in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2016, 273(4): 801-809.
- [16] SUMIYOSHI H, MATSUSHITA A, NAKAMURA Y, et al. Suppression of STAT5b in pancreatic cancer cells leads to attenuated gemcitabine chemoresistance, adhesion and invasion [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(6): 3216-3226.
- [17] JINAWATH N, VASOONTARA C, JINAWATH A, et al. Oncoproteomic analysis reveals co-upregulation of RELA and STAT5 in carboplatin resistant ovarian carcinoma [J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11198.

(收稿日期: 2017-09-18 修回日期: 2017-12-16)

(上接第 1300 页)

- [19] DIEKHOFF T, ZIEGELER K, FEIST E, et al. First experience with single-source dual-energy computed tomography in six patients with acute arthralgia: a feasibility experiment using joint aspiration as a reference [J]. *Skeletal Radiol*, 2015, 44(11): 1573-1577.
- [20] 梁丹, 郭红梅, 段济杰, 等. 免服泻药管电压切换型双能

CT 结肠成像泛影葡胺标记肠内容物的研究 [J]. *重庆医学*, 2016, 45(31): 4327-4330.

- [21] 梁丹, 郭红梅, 段济杰, 等. 双能 CT 结肠成像部分自动个体化充注空气扩张结直肠的研究 [J]. *重庆医学*, 2017, 46(14): 1897-1899, 1903.

(收稿日期: 2017-09-18 修回日期: 2017-12-21)