

# microRNA-125b 在葛根素诱导 人卵巢癌细胞 SKOV3 凋亡中的作用研究<sup>\*</sup>

张悦<sup>1a</sup>, 段海霞<sup>2</sup>, 暴蕾<sup>1a</sup>, 符乔珊<sup>1b</sup>

(西安市第四医院 a. 妇产科; b. 生殖科, 西安 710004; 2. 西北妇女儿童医院生殖妇科, 西安 710056)

**摘要:**目的 探讨 microRNA-125b 在葛根素诱导卵巢癌细胞 SKOV3 凋亡中的重要作用。方法 运用 qRT-PCR 技术检测葛根素处理卵巢癌细胞 SKOV3 中 microRNA-125b 的改变。运用干涉 RNA 技术抑制 SKOV3 细胞中 microRNA-125b 表达。运用 Western blot 技术检测 SKOV3 细胞 microRNA-125b 低表达后, 葛根素处理组与对照组中凋亡相关蛋白的改变。结果 葛根素能够显著抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖活力以及促进其凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3, Bax 和 Bcl-2 的表达, 并且初步揭示了葛根素处理卵巢癌细胞 SKOV3 后能够促进 microRNA-125b 的表达; 抑制卵巢癌细胞 SKOV3 中 microRNA-125b 的表达能够降低葛根素对 SKOV3 细胞凋亡蛋白 Cleaved Caspase-3, Bax 和 Bcl-2 的表达。结论 microRNA-125b 参与了葛根素对卵巢癌细胞 SKOV3 的促凋亡作用, 提示 microRNA-125b 是卵巢癌细胞 SKOV3 耐药机制中的关键分子。

**关键词:** 卵巢癌; 葛根素; microRNA-125b; 凋亡

中图分类号: R737.31; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)05-013-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.004

## Role of MicroRNA-125b in Human Ovarian Cancer Cell SKOV3 Induced Apoptosis by Puerarin

ZHANG Yue<sup>1a</sup>, DUAN Hai-xia<sup>2</sup>, BAO Lei<sup>1a</sup>, FU Qiao-shan<sup>1b</sup>

(1a. Department of Obstetrics and Gynecology;

1b. Department of Gynaecology, Xi'an Fourth Hospital, Xi'an 710004 China; 2. Department of Gynaecology, Northwest of Reproductive Women Children's Hospital, Xi'an 710056, China)

**Abstract:** **Objective** To explore whether puerarin induced apoptosis of SKOV3 ovarian cancer cells by microRNA-125b. **Methods** Using the qRT-PCR technique to detect the change of microRNA-125b after puerarin pretreated SKOV3. Using RNA interference technology to inhibit microRNA-125b expression in SKOV3 cells. Using Western blot technique to detect apoptosis related proteins after microRNA-125b lower expression. **Results** Puerarin could significantly inhibit ovarian cancer cell SKOV3 proliferation activity and promote its apoptosis related proteins expression. And puerarin can promote the expression of microRNA-125b. Inhibition of microRNA-125b expression in ovarian cancer cell SKOV3 could reduce apoptosis protein expression in SKOV3 cell. **Conclusion** MicroRNA-125b was involved in puerarin induced SKOV3 cell apoptosis, and prompt microRNA-125b is key molecular of the drug resistance in SKOV3.

**Keywords:** ovarian; puerarin; microRNA-125b; apoptosis

起源于卵巢组织的恶性肿瘤是当今威胁女性健康的重要疾病之一,死亡率占各种妇科肿瘤的首位。尽管近年来手术方式和治疗手段不断改进,但5年生存率并不乐观。寻找能够帮助提高临床化疗药物敏感性的有效方式是突破该病治疗的重要途径<sup>[1~3]</sup>。

葛根素是从中草药葛根中分离提取的一种物质,近年来的研究表明葛根素具有抑制肿瘤细胞过度增殖、促进肿瘤细胞凋亡的作用。我们的前期研究结果也表明葛根素能够明显增加化疗药物对肿

瘤的杀伤效果,但其具体机制仍然不清<sup>[4]</sup>。

MicroRNA 是动植物界中广泛存在的一类非编码小 RNA,参与着细胞转录后续的基因表达、增殖、凋亡等生理过程。研究指出 microRNA 很可能参与了肿瘤细胞的耐药机制。本课题通过观察葛根素处理的卵巢癌细胞 SKOV3 中 microRNA-125b 的表达改变,探讨葛根素是否通过 microRNA-125b 的改变来诱导卵巢癌细胞 SKOV3 的凋亡作用<sup>[4,5]</sup>。

### 1 材料与方法

\* 基金项目:国家自然科学基金青年项目:Notch 信号通路介导的神经干细胞自噬在铅神经毒性中的重要作用(81602815)。

作者简介:张悦(1984—),女,硕士,主治医师,专业:妇科肿瘤, E-mail: 304079774@qq.com,

通讯作者:符乔珊(1974—),女,硕士,主任医师,专业:妇科肿瘤, E-mail: 157886964@qq.com。

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株:人卵巢癌细胞株 SKOV3,由第四军医大学第一附属医院西京医院妇产科赠送。

1.1.2 试剂:葛根素单体(美国 Gbico 公司);RP-MI-1640 培养基(美国 Gbico BRL 公司);细胞培养用 DMSO(上海华美生物公司);新生小牛血清(杭州四季青生物公司); $\beta$ -actin 抗体, Caspase-3 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);RIPA(H)裂解液(碧云天公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 MTT 检测细胞增殖活性:选用 96 孔板,每孔加入 0.1 ml 的细胞培养液,在 37℃ 5 ml/dl CO<sub>2</sub> 的孵箱内培育 2~3 h 让细胞贴壁。吸去培养液,用 PBS 洗涤 3 次。每孔加 0.1 ml PBS 和 10  $\mu$ l MTT 染液,在 37℃, 5 ml/dl CO<sub>2</sub> 的饱和水汽二氧化碳培养箱中培养 4~6 h。每孔加 0.1 ml 酸化异丙醇,也可用含 10g/dl SDS 的 10 mmol/L HCl 代替酸化异丙醇,在振荡器上振荡混匀,让还原产物充分溶解。置酶联检测仪上测定吸光度(A)值,检测波长 570 nm,参考波长 630 nm。以 A 值对样品稀释度作图,比较标准曲线和待测样品曲线即可求得待测样品中细胞因子的含量。

1.2.2 Western blot 试验:常规收集葛根素处理的 SKOV3 细胞,运用细胞裂解液在冰上裂解 30 min, 1 200 r/min 离心 5 min,收集细胞裂解蛋白放入 EP 管中。运用 AB 法进行蛋白定量,检测各组样品中蛋白的浓度。运用 6 $\times$ 的上样缓冲液与之混匀,100℃加热 5 min,使之变性。随后在进行蛋白电泳,电转。洗去电转液后封闭硝酸纤维素膜。室温下封闭 1 h,分别 4℃孵育一抗 Cleaved Caspase-3, Actin, Bcl-2, Bax 等蛋白过夜。洗膜后加入相应的辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:1000),室温摇晃 1 h, TBST 充分洗膜,加入免疫印迹化学发光试剂,处理 3~5 min,应用分子凝胶系统成像并进行目的条带灰度分析<sup>[6,7]</sup>。

1.2.3 qRT-PCR 检测:提取细胞中 miRNA:收集细胞在 RNase-Free 的 EP 管中,裂解液处理后低温高速离心,取上清液加氯仿处理后取上层水相,移入 EP 管中。缓慢加入 1.5 倍体积的无水乙醇混匀后转入吸附柱中,加去蛋白液 MRD 处理,高速离心后弃废液,再次向其中加入漂洗液,离心;转移至另一 EP 管中离心去除残液。将吸附柱置于超净台上通风晾干,转入一个新的 RNase-Free 的 EP 管,加入 ddH<sub>2</sub>O 处理后离心收集<sup>[8,9]</sup>。

qRT-PCR 流程:①构建 microRNA-125b 的引物序列:5'-TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA-3', U6 的引物序列:5'-CGCTTCGGCAGCA-

CATATACTA-3';②进行逆转录反应;③实时定量 PCR 反应。

1.2.4 干涉 mRNA-125b:首先在吉凯基因公司构建 mRNA-125b 的干涉基因,前体序列为:5'-TCCCTGAGAACCCTAACTTGTGA-3'。运用 Lip2000 试剂盒进行转染卵巢癌细胞 SKOV3,转染的浓度 50 nmol/L。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,多组间数据比较采用 one-way ANOVA 分析;结果以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,  $P<0.05$  为差异具有统计学意义<sup>[10]</sup>。

## 2 结果

2.1 葛根素能够抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖活动 我们运用葛根素对卵巢癌细胞 SKOV3 进行干预,通过前期对葛根素浓度的筛选,我们最终确定葛根素的处理浓度为 500  $\mu$ g/ml,分别观察 24 h, 48 h 后卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖活力。结果发现,葛根素处理的卵巢癌细胞 SKOV3 为 65.36% $\pm$ 6.24%, 24 h 的增殖活力较对照组(100% $\pm$ 7.62%)相比有所降低( $P<0.05$ ), 48 h (47.51% $\pm$ 3.90%)较对照组(100% $\pm$ 5.71%)相比降低更为明显( $P<0.05$ ),差异具有统计学意义。

2.2 葛根素能够促进卵巢癌细胞 SKOV3 的凋亡发生 运用 Western blot 实验检测卵巢癌细胞 SKOV3 葛根素处理与未处理组凋亡相关蛋白 Caspase-3, Bcl-2, Bax 的改变,结果提示葛根素处理 48 h 后,卵巢癌细胞 SKOV3 的 Caspase-3 剪切增加,凋亡相关蛋白 Bax 表达增多,见图 1。提示,葛根素处理促进了卵巢癌细胞 SKOV3 的凋亡发生,较对照组降低更为明显,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

2.3 葛根素能够诱导卵巢癌细胞 SKOV3 miRNA-125b 的升高 我们设计了 microRNA-125b 引物,运用 qRT-PCR 检测了葛根素处理及未处理后的卵巢癌细胞 SKOV3 中 microRNA-125b 的表达情况。结果发现葛根素处理 48 h 后,卵巢癌细胞 SKOV3 的 microRNA-125b 表达(2.94 $\pm$ 0.26)与对照组(1)相比显著增加( $P<0.05$ ),见图 2。提示 microRNA-125b 可能参与了葛根素对卵巢癌细胞 SKOV3 的促凋亡过程。

2.4 microRNA-125b 在葛根素对卵巢癌细胞 SKOV3 促凋亡过程中发挥着关键作用 我们运用干涉 RNA 技术抑制了卵巢癌细胞 SKOV3 中 microRNA-125b 的表达,然后进行葛根素的处理,发现当 microRNA-125b 被抑制后,葛根素对卵巢癌细胞 SKOV3 的促凋亡显著降低,并且葛根素对

卵巢癌细胞 SKOV3 增殖活力的抑制作用与对照组相比显著降低 ( $P < 0.05$ )。

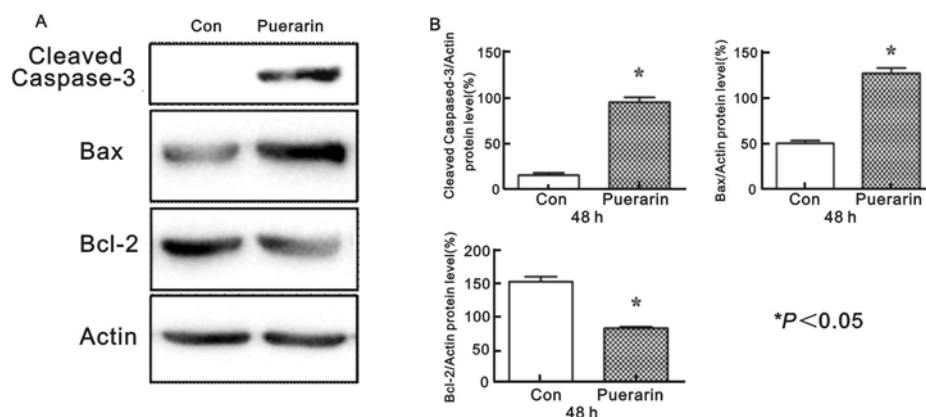


图1 葛根素处理 SKOV3 细胞 48h 后凋亡相关蛋白的改变

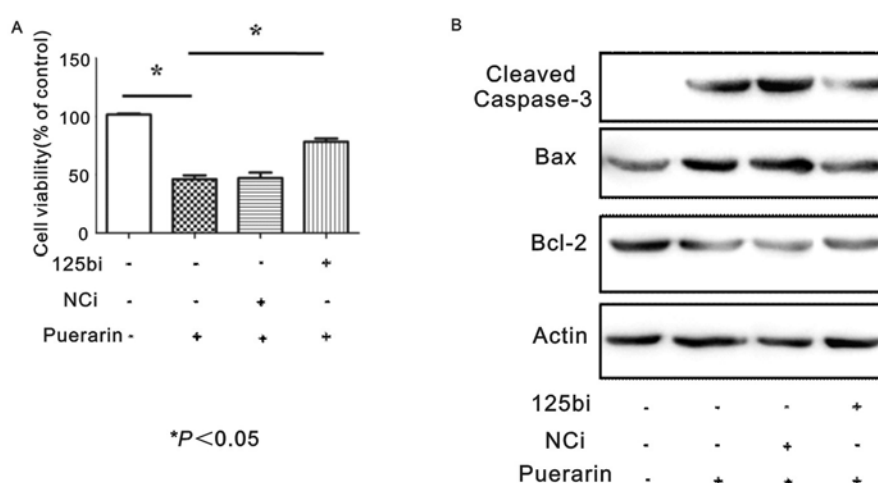


图2 microRNA-125b 低表达后对葛根素诱导 SKOV3 细胞活力和凋亡的影响

3 讨论 卵巢组织的恶性肿瘤是当今威胁女性健康的重要疾病之一,死亡率占各种妇科肿瘤的首位。目前针对卵巢癌的治疗以及化疗存在一定的局限性,尤其是化疗药物的选择方面。目前运用我国传统的中药进行抗癌的药物很多,葛根素就是其中一种。之前的研究发现葛根素能够有效地抑制肝癌、胆囊癌、肺癌的增殖。我们的研究发现葛根素对卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖和凋亡也有一定的作用。葛根素能够有效抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖活力,同时促进卵巢癌细胞 SKOV3 中凋亡相关蛋白 Caspase-3 的剪切,以及凋亡相关蛋白 Bax 的转位。凋亡是肿瘤细胞死亡的一种典型方式,除了凋亡的死亡方式外,坏死和自噬也有可能参与肿瘤细胞的死亡过程,在这里我们只关注了葛根素对卵巢癌细胞的凋亡损伤形式,对与其它的两种方式,可能葛根素在抑制卵巢癌细胞增殖过程中也发挥了一定作用,我们这里并未进行深入研究。

葛根素在各种肿瘤细胞的发生过程中均发挥了抑癌作用,但均停留在现象的研究,其中的具体

分子机制尚未阐明。MicroRNA 是一类非编码小 RNA,参与细胞转录后续的基因表达、增殖、凋亡等生理过程<sup>[11~13]</sup>。在葛根素促进卵巢癌细胞 SKOV3 凋亡过程中很有可能 microRNA 参与了其中。我们发现在葛根素的诱导下, microRNA-125b 的表达水平显著增高, microRNA-125b 的增高可能参与了葛根素抑制卵巢癌细胞的过程。为了验证我们的假设,我们运用 RNA 的模拟物抑制 microRNA-125b 表达后,观察了葛根素处理后的卵巢癌细胞,发现葛根素诱导卵巢癌细胞 SKOV3 的 Caspase-3 剪切以及凋亡相关蛋白 Bax 转位降低。并且 MTT 显示其对卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖过程也产生了影响。以上的结果说明了在抑制 microRNA-125b 表达后葛根素对卵巢癌细胞 SKOV3 的促凋亡作用、抑增殖作用显著降低,进一步提示 microRNA-125b 在葛根素杀伤卵巢癌细胞 SKOV3 中发挥着关键作用。 microRNA-125b 很可能参与了肿瘤细胞的耐药机制,深入地研究将会为卵巢癌的临床治疗提供重要的手段。

参考文献:

(下转 117 页)

- [1] Kim J, Coffey DM, Creighton CJ, et al. High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(10):3921-3926.
- [2] Nam EJ, Yoon H, Kim SW, et al. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 14(9):2690-2695.
- [3] Thiery JP, Acloque H, Huang R, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. *Cell*, 2015, 139(5):871-890.
- [4] 包启年, 蒋 卉, 郑 骏, 等. 葛根素对卵巢裸鼠荷人乳腺癌肿瘤生长的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(6):1459-1462.
- Bao QN, Jiang H, Zheng J, et al. Effect of Puerarin on growth of human breast cancer in nude mice[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2017, 35(6):1459-1462.
- [5] Wang Y, Yan S, Liu X, et al. miR-123-3p represses the cell migration and invasion abilities by targeting ZEB1 in high-grade serous ovarian carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(4):1905-1910.
- [6] Hu X, Macdonald DM, Huettner PC, et al. A miR-200 cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 114(3):457-464.
- [7] Zhang JB, Cao R, Cai T, et al. The role of autophagy dysregulation in manganese-induced dopaminergic neurodegeneration[J]. *Neurotox Res*, 2014, 24(4):478-490.
- [8] Zhang JB, Cai TJ, Zhao F, et al. The role of  $\alpha$ -synuclein and tau hyperphosphorylation mediated autophagy and apoptosis in lead-induced learning and memory injury[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2012, 8(7):935-944.
- [9] Zhang S, Chen L, Cui B, et al. ROR1 is expressed in human breast cancer and associated with enhanced tumor-cell growth[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e31127.
- [10] Tang H, Yao L, Tao X, et al. miR-9 functions as a tumor suppressor in ovarian serous carcinoma by targeting TLN1[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(2):381-388.
- [11] Yuan J, Wang K, Xi M, et al. MiR-494 inhibits epithelial ovarian cancer growth by targeting c-Myc[J]. *Med Sci Monitor*, 2016(22):617-624.
- [12] Wang W, Ren F, Wu Q, et al. MicroRNA-497 suppresses angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor A through the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways in ovarian cancer[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(5):2127-2133.
- [14] 雷 磊, 王艳丽, 梁 静, 等. 卵巢上皮癌差异表达 microRNAs 的筛选研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(2):398-402.
- Lei L, Wang YL, Liang J, et al. Identification of differentially expressed microRNAs in epithelial ovarian cancer[J]. *Modern Oncology*, 2013, 21(2):398-402.
- [15] Tan H, He Q, Gong G, et al. miR-382 inhibits migration and invasion by targeting ROR1 through regulating EMT in ovarian cancer[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(1):181-190.

收稿日期:2017-05-09

修回日期:2017-07-09