

miR-296 靶向 FGFR1 对卵巢癌细胞生长、迁移及侵袭的影响^{*}

李忆东 李婷婷 赵珠峰 吴国忠

(上海杉达学院国际医学技术学院基础医学部, 上海 201209)

【摘要】 目的 探讨 miR-296 靶向成纤维细胞生长因子受体 1(FGFR1)对卵巢癌细胞生长、迁移及侵袭的影响。**方法** 体外培养人 SK-OV-3 细胞,并将细胞分为对照组、miR-296 NC 组、miR-296 mimics 组、miR-296 mimics+FGFR1 NC 组、miR-296 mimics+FGFR1 组。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测细胞中 miR-296、FGFR1 mRNA 水平;细胞计数试剂盒 8(CCK-8)检测细胞活力;Transwell 法检测细胞迁移和侵袭能力;蛋白免疫印迹(WB)法检测增殖、迁移和侵袭蛋白的表达;双荧光素酶报告实验分析 miR-296 与 FGFR1 的靶向关系。**结果** 与对照组比较,miR-296 mimics 组 miR-296 表达显著升高,FGFR1 mRNA 表达显著降低($P<0.05$);与 miR-296 mimics 组比较,miR-296 mimics+FGFR1 组 miR-296 表达差异无统计学意义($P>0.05$),FGFR1 mRNA 表达显著升高($P<0.05$)。与对照组比较,miR-296 mimics 组细胞活力、迁移和侵袭细胞数目、蛋白 FGFR1、增殖蛋白 β -catenin、CyclinD1、迁移蛋白 MMP-2、侵袭蛋白 N-cadherin 表达显著降低,E-cadherin 蛋白表达显著升高($P<0.05$);与 miR-296 mimics 组比较,miR-296 mimics+FGFR1 组细胞活力、迁移和侵袭细胞数目、蛋白 FGFR1、 β -catenin、CyclinD1、MMP-2、N-cadherin 表达显著升高,E-cadherin 蛋白表达显著降低($P<0.05$);双荧光素酶报告实验表明 miR-296 和 FGFR1 存在靶向关系。**结论** miR-296 可能通过靶向 FGFR1 抑制 SK-OV-3 细胞 EMT 途径,抑制细胞生长、迁移和侵袭。

【关键词】 miR-296;成纤维细胞生长因子受体 1;卵巢癌;迁移;侵袭

【中图分类号】 R737.31 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2023.05.004

Effects of miR-296 targeting FGFR1 on growth, migration and invasion of ovarian cancer cells

LI Yidong, LI Tingting, ZHAO Zhufeng, WU Guozhong

(Department of Basic Medicine, School of International Medical Technology, Shanghai Shanda College, Shanghai 201209, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of miR-296 on the growth, migration and invasion of ovarian cancer cells by targeting fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1). **Methods** SK-OV-3 cells were cultured in vitro and divided into control group, miR-296 NC group, miR-296 mimics group, miR-296 mimics + FGFR1 NC group and miR-296 mimics + FGFR1 group. The levels of miR-296 and FGFR1 mRNA were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). Cell viability was detected by cell counting kit 8 (CCK-8). Cell migration and invasion were detected by Transwell assay. Western blotting (WB) was used to detect the expression of proliferation, migration and invasion protein. Double luciferase reporter assay was used to analyze the targeting relationship between miR-296 and FGFR1. **Results** Compared with those in the control group, the expression of miR-296 in miR-296 mimics group was significantly increased, while the expression of FGFR1 mRNA was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with those in miR-296 mimics group, the expression of miR-296 in miR-296 mimics+FGFR1 group had no significant difference ($P>0.05$), but the expression of FGFR1 mRNA was significantly increased ($P<0.05$). Compared with those in the control group, the cell viability, the numbers of migration and invasion cells, the expression of FGFR1, β -catenin, CyclinD1, MMP-2 and N-cadherin in miR-296 mimics group were significantly decreased, while the expression of E-cadherin was significant-

基金项目:国家自然科学基金项目(81172100);上海杉达学院护理学重点学科重点立项课题(2019zz35-yj)

引用本文:李忆东,李婷婷,赵珠峰,等. miR-296 靶向 FGFR1 对卵巢癌细胞生长、迁移及侵袭的影响[J]. 西部医学, 2023, 35(5): 648-653. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2023.05.004

ly increased ($P < 0.05$). Compared with those in miR-296 mimics group, the cell viability, the numbers of migration and invasion cells, the expression of FGFR1, β -catenin, CyclinD1, MMP-2 and N-cadherin in miR-296 mimics + FGFR1 group were significantly increased, while the expression of E-cadherin was significantly decreased ($P < 0.05$). Dual luciferase reporter assay showed that there is a targeted relationship between miR-296 and FGFR1. **Conclusion** MiR-296 may inhibit the EMT pathway of SK-OV-3 cells by targeting FGFR1, and inhibit cell growth, migration and invasion.

【Key words】 miR-296; Fibroblast growth factor receptor 1; Ovarian cancer; Migration; Invasion

卵巢癌是女性生殖器官常见恶性肿瘤之一,具有较高的发病率和死亡率,晚期预后差,严重威胁妇女健康^[1]。遗传、内分泌及环境等均是影响卵巢癌发生的因素,然而有关卵巢癌发生发展具体机制目前尚不清楚。肿瘤细胞的恶性增殖、浸润、侵袭能力是导致癌症复发和转移的主要原因,研究与卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭的有关机制,可能有助于卵巢癌治疗的研究。miRNA 是重要的转录后调节因子,在动植物和病毒中均存在表达,是关键基因调节器,其可与靶基因 3' 非转录区 (3'-untranslated regions, 3' UTR) 结合,负向调节基因表达,参与多种生物学功能、疾病和癌症的发生发展^[2]。研究表明 miR-296 通过靶向成纤维细胞生长因子受体 1 (Fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1) 抑制人肝细胞癌的增殖,并诱导其凋亡^[3]。因此,本研究通过体外培养卵巢癌细胞,分析 miR-296、FGFR1 对卵巢癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 人 SK-OV-3 细胞 (TCHu185), 中国科学院细胞库; McCoy 5A 培养基 (M4892), 美国 SIGMA 公司; 胎牛血清 (10099)、胰蛋白酶 (25200056), 美国 Gibco 公司; Lipofectamine 3000 试剂盒 (L3000001), 美国 Thermo Fisher 公司; RNAiso plus (9108Q), 日本 TAKARA 公司; QuantiTect Reverse Transcription Kit (205311)、SYBR Green Kit (216213), 德国 QIAGEN 公司; 单抗 FGFR1 (9740)、细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1, 55506)、 β -连环蛋白 (β -catenin, 8480)、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2) (40994)、神经型钙黏附蛋白 (N-cadherin, 13116)、上皮型钙黏附蛋白 (E-cadherin, 3195)、 β -actin (4970), 美国 cell signaling technology 公司; 细胞计数试剂盒 8 (cell counting Kit-8, CCK-8) (C0037)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (A0208)、蛋白提取试剂盒 (P0033)、BCA 蛋白定量试剂盒 (P0012), 上海碧云天生物技术公司; miR-296、FGFR1 mRNA、U6、GAPDH、miR-296 mimics、miR-296 mimics NC、FGFR1-NC、FGFR1, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。实时荧光定量 PCR

(Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR) 仪 (CFX96)、蛋白凝胶成像仪 (Gel Doc), 美国伯乐公司; 多功能酶标仪 (Varioskan™ LUX), 美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 对 SK-OV-3 细胞进行常规复苏, 转移至含 10% 胎牛血清的 McCoy 5A 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞融合度达到 80%~90% 时, 胰蛋白酶消化, 传代培养。细胞生长至稳定对数期时, 取对数期 SK-OV-3 细胞, 胰蛋白酶消化, 调整浓度为 5×10^5 个/孔接种至 6 孔板, 常规培养。细胞融合度达到 60%~80% 时, 更换新鲜培养基, 按照 Lipofectamine 3000 试剂盒说明书对 SK-OV-3 细胞进行转染, 并将细胞分为对照组 (仅添加培养基)、miR-296 NC 组 (转染 miR-296 mimics NC 质粒)、miR-296 mimics 组 (转染 miR-296 mimics 质粒)、miR-296 mimics+FGFR1 NC 组 (转染 miR-296 mimics 和过表达 FGFR1 阴性对照质粒)、miR-296 mimics+FGFR1 组 (转染 miR-296 mimics 和过表达 FGFR1 质粒), 继续培养 48 h。

1.2.2 qRT-PCR 检测各组细胞中 miR-296、FGFR1 mRNA 的表达水平 细胞转染 48 h 后, 按照 RNAiso Plus 试剂盒说明书对上述中各组细胞的总 RNA 进行提取, QuantiTect Reverse Transcription Kit 将提取的细胞总 RNA 反转录成 cDNA, 之后进行 qRT-PCR 反应, 反应条件为预变性 95 °C 60 s; 95 °C 45 s, 60 °C 45 s, 延伸 72 °C 30 s, 共计 40 个循环。分别以 U6、GAPDH 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算各组细胞中 miR-296、PSM2 mRNA 的相对表达量。miR-296 上游引物序列为 5'-TGCCTAATTCAGAGGGT-TGG-3', 下游引物序列为 5'-CTCCACTCCTGGCA-CACAGAG-3'; FGFR1 mRNA 上游引物序列为 5'-CTTCGTTTCTTGTTGGTAGGC-3', 下游引物序列为 5'-GGACAGGATGGAGTTTGGAC-3'; U6 上游引物序列为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 下游引物序列为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; GAPDH 上游引物序列为 5'-ACTCCTCCACCTTT-GACGCTG-3', 下游引物序列为 5'-CTCTCTTCCTC-TTGTGCTCTTGC-3'。

1.2.3 CCK8 法检测各组细胞活力 取 1.2.1 中各组对数期生长细胞,胰蛋白酶消化,调整浓度为 5×10^4 个/孔加至 96 孔板中,每组设置 6 个重复,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,加入 10 μL CCK-8 试剂,37℃ 避光培养 2 h,弃上清。酶标仪 450 nm 处检测吸光度 OD 值,计算细胞活力(%)=[(实验组 OD 值/对照组 OD 值)]×100%。

1.2.4 Transwell 法检测各组细胞迁移和侵袭情况 细胞迁移实验:取 1.2.1 中各组对数期生长细胞,胰蛋白酶消化,调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL,每组 3 个重复,吸取 100 μL 细胞悬液加至 Transwell 小室上室,Transwell 下室加入 600 μL 含胎牛血清的完全培养基,37℃ 培养 24 h,倒掉上室培养液,棉签擦去未迁移细胞,无水甲醇固定 30 min,0.1% 结晶紫溶液染色 20 min,显微镜下随机选取 5 个视野对染色细胞进行计数,计算平均值。细胞侵袭实验:Transwell 小时上室包被 Matrigel 胶,其与步骤同细胞迁移实验。

1.2.5 蛋白免疫印迹(western blot, WB)法检测蛋白表达 取 1.2.1 中各组对数期生长细胞,调整浓度为 2×10^6 个/mL,每组设置 3 个重复,每孔 100 μL 加至 24 孔板中培养,蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒测定总蛋白浓度。蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉遮光封闭 2 h;分别加入一抗稀释液(β-catenin、CyclinD1、N-cadherin、E-cadherin、FGFR1、β-actin)均为 1:1000 稀释,4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜,加入辣根过氧化物酶标记二抗稀释液(1:2000),室温孵育 1 h,TBST 洗膜。蛋白凝胶成像仪分析蛋白表达水平。

1.2.6 双荧光素酶报告系统分析 miRDB 数据库(<http://www.mirdb.org/>)对 miR-296 及 FGFR1 结合位点进行预测,对含结合位点的 FGFR1 的 3'UTR 区段进行扩增,并插入到 pGL3 载体上,构建 pGL3-FGFR1-3'UTR-WT 质粒;再对结合片段进行定点突变,构建 pGL3-FGFR1-3'UTR-Del 质粒。pGL3-FGFR1-3'UTR-WT 质粒、pGL3-FGFR1-3'UTR-Del 质粒分别与 miR-296-NC、miR-296 mimics 共转染到 SK-OV-3 中,每组设置 3 个重复,转染 6 h 后,更换培养基。质粒共转染 48 h 后,弃去培养基,PBS 洗涤细胞 2 次;每孔加入 50 μL 的 1×PLB,震荡使细胞全部裂解;不透光 96 孔酶标板中每孔加上上述上清液 10 μL,再加入 100 μL 双荧光素酶反应试剂 II,检测萤火虫荧光素酶反应强度,测定结束后加 100 μL Stop&Glo,检测内参海肾荧光素酶反应强度。荧光素酶相对活性=萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶

活性值。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,SNK 法进行两两组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-296 过表达对 SK-OV-3 细胞中 miR-296、FGFR1 mRNA 的表达 与对照组比较,miR-296 NC 组 miR-296、FGFR1 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$),miR-296 mimics 组 miR-296 表达显著升高,FGFR1 mRNA 表达显著降低($P < 0.05$);与 miR-296 mimics 组比较,miR-296 mimics+FGFR1-NC 组 miR-296、FGFR1 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$),miR-296 mimics+FGFR1 组 miR-296 表达差异无统计学意义($P > 0.05$),FGFR1 mRNA 表达显著升高($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组 SK-OV-3 细胞 miR-296、FGFR1 mRNA 的表达($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of miR-296 and FGFR1 mRNA in SK-OV-3 cells of each group

组别	miR-296/ U6	FGFR1 mRNA/ GAPDH
对照组	1.00	1.00
miR-296 NC 组	1.03 ± 0.24	1.02 ± 0.18
miR-296 mimics 组	$2.47 \pm 0.52^{\text{①}}$	$0.53 \pm 0.31^{\text{①}}$
miR-296 mimics+FGFR1-NC 组	2.51 ± 0.48	0.47 ± 0.29
miR-296 mimics+FGFR1 组	2.44 ± 0.45	$0.86 \pm 0.33^{\text{②}}$

注:与对照组、miR-296 NC 组比较,① $P < 0.05$;与 miR-296 mimics 组、miR-296 mimics+FGFR1-NC 组比较,② $P < 0.05$ 。

2.2 CCK-8 法检测各组 SK-OV-3 细胞增殖情况 与对照组比较,miR-296 NC 组细胞活力差异无统计学意义($P > 0.05$),miR-296 mimics 组细胞活力显著降低($P < 0.05$);与 miR-296 mimics 组比较,miR-296 mimics+FGFR1-NC 组细胞活力差异无统计学意义($P > 0.05$),miR-296 mimics+FGFR1 组细胞活力显著升高($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组 SK-OV-3 细胞活力比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of SK-OV-3 cell viability in each group

组别	细胞活力($\times 10^{-2}$)
对照组	100
miR-296 NC 组	98.45 ± 9.26
miR-296 mimics 组	$64.32 \pm 13.48^{\text{①②}}$
miR-296 mimics+FGFR1-NC 组	65.48 ± 12.39
miR-296 mimics+FGFR1 组	$87.63 \pm 15.47^{\text{③④}}$

注:与对照组比较,① $P < 0.05$;与 miR-296 NC 组比较,② $P < 0.05$;与 miR-296 mimics 组比较,③ $P < 0.05$,与 miR-296 mimics+FGFR1-NC 组比较,④ $P < 0.05$ 。

2.3 Transwell 法检测 SK-OV-3 细胞迁移和侵袭能力 与对照组比较,miR-296 NC 组细胞迁移和侵袭数目差异无统计学意义($P>0.05$),miR-296 mimics 组细胞迁移和侵袭数目显著降低($P<0.05$);与 miR-296 mimics 组比较,miR-296 mimics+FGFR1-NC 组细胞迁移和侵袭数目差异无统计学意义($P>0.05$),miR-296 mimics+FGFR1 组细胞迁移和侵袭数目显著升高($P<0.05$)。见表 3、图 1。

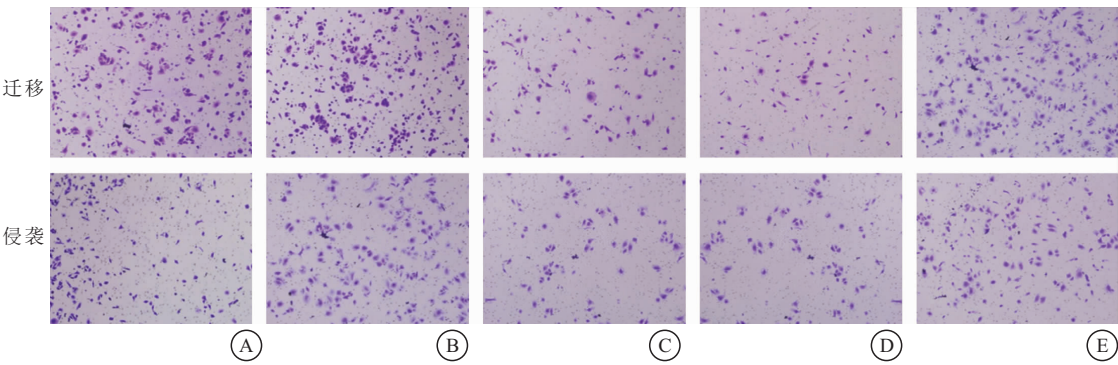


图 1 SK-OV-3 细胞迁移和侵袭

Figure 1 Migration and invasion of SK-OV-3 cells

注:A. 对照组;B. miR-296 NC 组;C. miR-296 mimics 组;D. miR-296 mimics+FGFR1-NC 组;E. miR-296 mimics+FGFR1 组。

2.4 WB 法检测 SK-OV-3 细胞增殖、迁移侵袭蛋白的表达 与对照组比较,miR-296 NC 组增殖、迁移侵袭蛋白差异无统计学意义($P>0.05$),miR-296 mimics 组细胞 FGFR1、 β -catenin、CyclinD1、MMP-2、N-cadherin 蛋白表达显著降低,E-cadherin 蛋白表达显著升高($P<0.05$);与 miR-296 mimics 组比较,miR-

表 3 各组 SK-OV-3 细胞迁移和侵袭能力比较($n=3,\bar{x}\pm s$,个)
Table 3 Comparison of migration and invasion ability of SK-OV-3 cells in each group

组别	迁移数目	侵袭数目
对照组	235.29 $\pm$ 32.84	123.46 $\pm$ 18.42
miR-296 NC 组	228.46 $\pm$ 29.43	118.75 $\pm$ 16.38
miR-296 mimics 组	113.78 $\pm$ 23.51 ^①	52.39 $\pm$ 15.44 ^①
miR-296 mimics+FGFR1-NC 组	103.85 $\pm$ 31.42	58.69 $\pm$ 17.25
miR-296 mimics+FGFR1 组	189.77 $\pm$ 25.49 ^②	103.54 $\pm$ 13.57 ^②

注:与 miR-296 NC 组比较,① $P<0.05$;与 miR-296 mimics 组比较,② $P<0.05$ 。

296 mimics+FGFR1-NC 组细胞增殖、迁移侵袭蛋白差异无统计学意义($P>0.05$),miR-296 mimics+FGFR1 组细胞 FGFR1、 β -catenin、CyclinD1、MMP-2、N-cadherin 蛋白表达显著升高,E-cadherin 蛋白表达显著降低($P<0.05$)。见表 4、图 2。

表 4 miR-296 对 SK-OV-3 细胞蛋白表达的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)
Table 4 Effect of miR-296 on protein expression of SK-OV-3 cells

组别	FGFR1	β -catenin	CyclinD1	MMP-2	N-cadherin	E-cadherin
对照组	1.15 $\pm$ 0.24	1.27 $\pm$ 0.28	1.14 $\pm$ 0.21	1.35 $\pm$ 0.17	0.97 $\pm$ 0.13	0.65 $\pm$ 0.12
miR-296 NC 组	1.19 $\pm$ 0.18	1.34 $\pm$ 0.25	1.31 $\pm$ 0.19	1.33 $\pm$ 0.14	0.99 $\pm$ 0.11	0.67 $\pm$ 0.09
miR-296 mimics 组	0.41 $\pm$ 0.21 ^①	0.51 $\pm$ 0.23 ^①	0.37 $\pm$ 0.17 ^①	0.59 $\pm$ 0.19 ^①	0.42 $\pm$ 0.09 ^①	1.12 $\pm$ 0.14 ^①
miR-296 mimics+FGFR1-NC 组	0.36 $\pm$ 0.15	0.49 $\pm$ 0.19	0.33 $\pm$ 0.23	0.62 $\pm$ 0.21	0.36 $\pm$ 0.07	1.09 $\pm$ 0.16
miR-296 mimics+FGFR1 组	0.92 $\pm$ 0.17 ^②	1.12 $\pm$ 0.26 ^②	0.95 $\pm$ 0.16 ^②	1.12 $\pm$ 0.23 ^②	0.84 $\pm$ 0.15 ^②	0.70 $\pm$ 0.08 ^②

注:与 miR-296 NC 组比较,① $P<0.05$;与 miR-296 mimics+FGFR1-NC 组比较,② $P<0.05$ 。

2.5 miR-296 对 FGFR1 基因的靶向调节作用 Starbase(<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)数据库预测结果表明,FGFR1 基因 3'UTR 区含有与 miR-296 结合位点,位于 595-602 区域(图 3A)。荧光素酶报告基因结果进一步显示,与 miR-296 NC-pGL3-FGFR1-3'UTR-WT 组比较,miR-296 mimics-pGL3-FGFR1-3'UTR-WT 组荧光素酶活性显著降低($P<0.05$);miR-296 mimics-pGL3-FGFR1-3'UTR-Del 组荧光素酶活性无显著变化($P>0.05$),见图 3B。

3 讨论

癌症是导致人类死亡的主要原因之一,然而多数患者是死于转移性疾病而不是相应的原发肿瘤^[4],所以研究与肿瘤转移相关机制至关重要。据研究报道,miRNA 可直接结合靶基因的 3'UTR 区域来调节靶基因表达水平,进而影响细胞增殖、迁移等过程^[5]。还有研究显示,miR-296 在胰腺癌、肺腺癌、口腔鳞癌等多种癌细胞中的表达均显著降低,其过表达可有效降低癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力^[6-8]。国内外报道

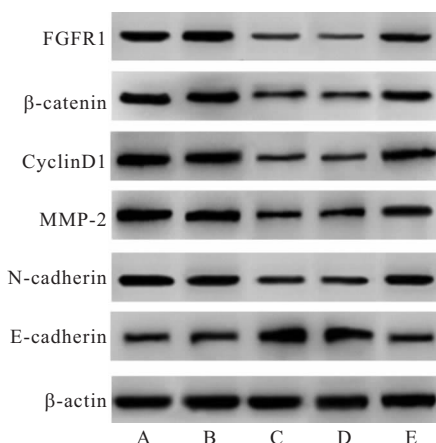


图 2 SK-OV-3 细胞增殖、迁移侵袭蛋白的表达

Figure 2 Expression of proliferation, migration and invasion proteins in SK-OV-3 cells

注: A. 对照组; B. miR-296 NC 组; C. miR-296 mimics 组; D. miR-296 mimics + FGFR1-NC 组; E. miR-296 mimics + FGFR1 组

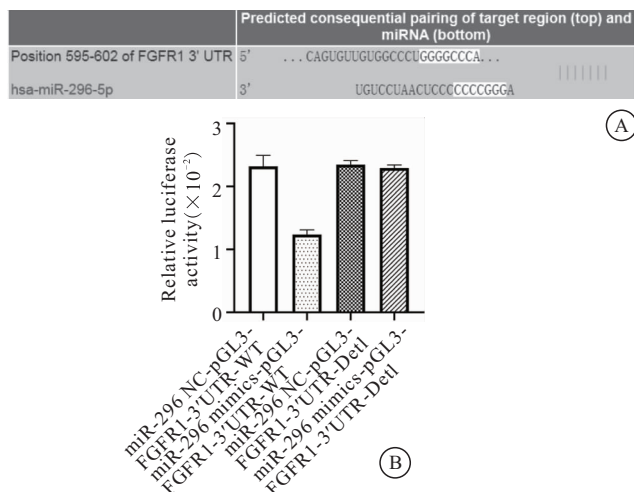


图 3 荧光素酶报告基因实验检测 miR-296 与 FGFR1 基因 3'UTR 区域的结合

Figure 3 Luciferase reporter assay of miR-296 binding to the 3'UTR region of FGFR1 gene

表明上皮间质转化 (Epithelial mesenchymal transition, EMT) 是上皮细胞获得间质细胞特性从而促进肿瘤细胞迁移和侵袭能力的生物学过程, 也是最常见的肿瘤侵袭和转移的起因^[9-10]。研究发现 EMT 对卵巢癌细胞迁移、侵袭的影响甚大^[11-12]。多个研究表明 miR-296 在多种癌症中异常表达与癌症细胞的 EMT 过程有关, 如 Chen 等^[13]研究表明 miR-296-5p 在人鼻咽癌组织中的表达显著低于癌旁组织, 且 miR-296 通过抑制转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 诱导的 EMT 途径, 抑制鼻咽癌细胞 CNE-2 和 5-8F 的迁移和侵袭。有研究表明^[14] miR-296-5p 过表达抑制体外肝癌细胞 Hep3B 的 EMT 途径, 抑制肝癌细胞肿瘤在小鼠体内的生长和转移。CyclinD1、

MMP-2 分别是指示增殖、迁移和侵袭能力的标志蛋白, 其表达失调可影响卵巢癌细胞的增殖与迁移、侵袭能力。本研究结果表明, miR-296 过表达能够抑制 SK-OV-3 细胞的迁移和侵袭, 降低 CyclinD1、MMP-2 表达水平, 与 Yan 等^[15]研究结果一致, 提示 miR-296 可能参与卵巢癌的发生发展机制。N-cadherin、E-cadherin 是 EMT 途径的标志蛋白, N-cadherin 能够介导同型和异型细胞间粘附, 与转化、血管生成、迁移和侵袭等肿瘤进展密切相关^[16]。E-cadherin 是粘附连接的关键成分, 在细胞粘附和维持细胞上皮表型中至关重要, E-cadherin 的缺失与细胞运动型增加和癌症晚期有关^[17]。 β -catenin 在恶性肿瘤细胞侵袭转移过程中起着非常重要的作用, 一方面 β -catenin 通过与 E-cadherin 相连形成复合物进而使上皮细胞稳定性和极性得到维持; 另一方面 β -catenin 在细胞核内表达水平的增加能够使 EMT 相关蛋白表达上调, 从而降低细胞间的黏附作用, 进而影响细胞的迁移和侵袭^[18-19]。本研究结果表明 miR-296 过表达能够抑制蛋白 N-cadherin 和 β -catenin 的表达, 促进蛋白 E-cadherin 蛋白的表达, 提示 miR-296 可能通过抑制 SK-OV-3 细胞的 EMT 途径, 进而抑制细胞的迁移和侵袭, 可能为卵巢癌治疗的潜在研究靶点。

FGFR1 属于酪氨酸激酶家族, 参与细胞增殖、血管生成等多种正常生物学过程, FGFR1 表达异常与肺癌、胃癌、乳腺癌等癌症的发生发展有关^[20-22]。研究表明 FGFR1 与上皮性卵巢癌的恶性转化和化学抗性有关^[23-24]。本研究对 SK-OV-3 细胞进行 miR-296 mimics 和 FGFR1 共转染, 结果表明, 与 miR-296 mimics 组比较, miR-296 mimics + FGFR1 组细胞活力、迁移和侵袭能力均显著升高, CyclinD1、MMP-2、 β -catenin、N-cadherin 蛋白表达显著升高, E-cadherin 蛋白表达显著降低, 提示 FGFR1 过表达能够逆转 miR-296 过表达引起的 SK-OV-3 细胞表型的改变和 EMT 抑制。本研究结果表明 miR-296 mimics 组 FGFR1 mRNA 与蛋白表达均显著降低, 提示 miR-296 可能负调控 FGFR1。在人类癌症中, miRNA 能够通过转录水平上调节靶基因的表达充当抑癌剂或促进剂, miRNA 通过与 mRNA 的 3'UTR 相结合来抑制基因的表达, 靶向基因降解, 阻止其翻译, 最终影响表型的改变^[25-26]。Sun 等^[27]研究表明 miR-296 通过靶向 FGFR1 在乳腺癌中发挥抑癌作用。本研究荧光素酶报告基因结果显示, 与 miR-296 NC-pGL3-FGFR1-3'UTR-WT 组比较, miR-296 mimics-pGL3-FGFR1-3'UTR-WT 组荧光素酶活性显著降低, 而 miR-296 mimics-pGL3-FGFR1-3'UTR-Del 组荧光素酶活

性无显著变化,提示 miR-296 可能靶向调控 FGFR1 的表达,抑制 SK-OV-3 细胞的 EMT 途径,抑制细胞的迁移和侵袭。

4 结论

综上所述,miR-296 可能靶向抑制 FGFR1 的表达抑制体外细胞 SK-OV-3 的 EMT 途径,抑制细胞 SK-OV-3 的增殖、侵袭和迁移。

【参考文献】

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] LIN S, GREGORY R I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(6): 321-333.
- [3] WANG L, BO X, ZHENG Q, *et al.* miR-296 inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting FGFR1 in human hepatocellular carcinoma[J]. FEBS Lett, 2016, 590(23): 4252-4262.
- [4] LAMBERT A W, PATTABIRAMAN D R, Weinberg R A. Emerging Biological Principles of Metastasis[J]. Cell, 2017, 168(4): 670-691.
- [5] 谢婷婷,苏瑛,吴利英,等. miR-455-3p 通过靶向调控转脂蛋白 4 抑制卵巢癌细胞 SKOV-3 的增殖、迁移及上皮间质转化[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(3): 306-311.
- [6] 尹健,朱光辉,单远洲,等. miR-296-5p 对胰腺癌细胞体外生物学行为的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(3): 335-339.
- [7] 刘洋,夏书月,武晶晶. miR-296 对人肺腺癌 A549 细胞恶性生物学行为的影响[J]. 中国医科大学学报, 2021, 50(3): 224-229.
- [8] 王黎策,张涛,金珊,等. miR-296-5p 靶向 MICB 促进口腔鳞癌生长的分子机制[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(18): 2243-2248.
- [9] 刘扬,王金佩,黄国友,等. 肿瘤上皮-间质转化(EMT)的生物力学特性研究进展[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2020, 46(6): 571-577.
- [10] MITTAL V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis[J]. Annu Rev Pathol, 2018, 13(1): 395-412.
- [11] 吕小慧,陈必良. 上皮间质转化在卵巢癌进展及化疗耐药中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(20): 3609-3613.
- [12] 王宝山,徐丽达,赵欣欣,等. KLF4 调控 TGF- β 通路减弱 EMT 抑制卵巢癌细胞的增殖、侵袭及转移[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(19): 2442-2446.
- [13] CHEN M, CHEN C, LUO H, *et al.* MicroRNA-296-5p inhibits cell metastasis and invasion in nasopharyngeal carcinoma by reversing transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. Cell Mol Biol Lett, 2020, 25(1): 49-49.
- [14] SHI D M, LI L X, BIAN X Y, *et al.* miR-296-5p suppresses EMT of hepatocellular carcinoma via attenuating NRG1/ERBB2/ERBB3 signaling[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 294-294.
- [15] YAN W, CHEN J, CHEN Z, *et al.* Deregulated miR-296/S100A4 axis promotes tumor invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition in human ovarian cancer[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(2): 260-269.
- [16] CAO Z Q, WANG Z, LENG P. Aberrant N-cadherin expression in cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118(1): 109320-109320.
- [17] MENDONSA A M, NA T Y, GUMBINER B M. E-cadherin in contact inhibition and cancer[J]. Oncogene, 2018, 37(35): 4769-4780.
- [18] 应伟佳,曾文杰,王瑞,等. 友菌素抑制人卵巢癌细胞增殖、侵袭及迁移的机制研究[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(24): 4843-4846.
- [19] 马燕,戴科军,恽一飞,等. 微小 RNA-1258 靶向调控 Wnt7b 对肝癌细胞迁移侵袭和 Wnt/ β -catenin 通路的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2021, 26(4): 329-334.
- [20] WANG K, JI W, YU Y, *et al.* FGFR1-ERK1/2-SOX2 axis promotes cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis in FGFR1-amplified lung cancer[J]. Oncogene, 2018, 37(39): 5340-5354.
- [21] XIE G, KE Q, JI Y Z, *et al.* FGFR1 is an independent prognostic factor and can be regulated by miR-497 in gastric cancer progression[J]. Braz J Med Biol Res, 2018, 52(1): 7816-7816.
- [22] MA F, ZHANG L, MA L, *et al.* MiR-361-5p inhibits glycolytic metabolism, proliferation and invasion of breast cancer by targeting FGFR1 and MMP-1[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 158-158.
- [23] OU L, HE X, LIU N, *et al.* Sialylation of FGFR1 by ST6GalI overexpression contributes to ovarian cancer cell migration and chemoresistance[J]. Mol Med Rep, 2020, 21(3): 1449-1460.
- [24] 李均,汤亚兰,唐方祥,等. 联合靶向抑制成纤维细胞生长因子受体和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白在卵巢癌发生发展中的作用机制[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2021, 13(3): 99-103.
- [25] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
- [26] CHEN P S, LIN S C, TSAI S J. Complexity in regulating microRNA biogenesis in cancer[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2020, 245(5): 395-401.
- [27] SUN W M, TAO W, LI J C, *et al.* MicroRNA-296 functions as a tumor suppressor in breast cancer by targeting FGFR1 and regulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(23): 10422-10432.

(收稿日期: 2021-11-08; 修回日期: 2023-03-28; 编辑: 张翰林)