

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.02.007

· 临床研究 ·

## miR-449b-5p 通过靶向 Cyclin E2 抑制卵巢癌细胞生长和细胞周期进展

李玲玲, 王玉珏, 岳军, 梅颀, 赵晓兰 (四川省医学科学院·四川省人民医院妇产科, 四川 成都 610027)

**[摘要]** **目的:** 探讨 miR-449b-5p 对卵巢癌细胞生长的作用和机制。**方法:** 选取 2018 年 6 月至 2020 年 6 月于四川省人民医院妇产科接受手术的 20 例卵巢癌患者的癌组织和癌旁组织, 以及正常卵巢上皮细胞系 HOSEpiC 和 6 种人宫颈癌细胞系 SKOV3、ES-2、OVCAR-3、HO8910、CaOV-3 和 A2780, 用 qPCR 检测卵巢癌组织和细胞中 miR-449b-5p 与 CCNE2 mRNA 的表达。将 miR-NC、miR-449b-5p mimic、miR-449b-5p inhibitor、pc-CCNE2 质粒分别或联合转染进入 SKOV3 细胞, 通过 CCK-8 法测定细胞生长, 流式细胞术检测细胞周期, WB 法检测 CCNE2 蛋白的表达。双荧光素酶报告实验验证 miR-449b-5p 与 CCNE2 的靶向关系。裸鼠皮下注射转染 miR-449b-5p mimic 的 SKOV3 细胞悬液构建移植瘤模型, 每周检测移植瘤体积, 第 42 天处死, 电子天平称皮下肿瘤重量, 免疫组化法检测移植瘤组织中 CCNE2 和 Ki67 的表达。**结果:** 与正常卵巢组织和上皮细胞系 HOSEpiC 相比, miR-449b 在人宫颈癌组织和细胞系 SKOV3、ES-2、OVCAR-3、HO8910、CaOV-3 和 A2780 中表达明显下调 ( $P < 0.01$ )。与 Control 组相比, miR-449b mimic 组 SKOV3 细胞增殖明显受到抑制 ( $P < 0.01$ ), G0/G1 期细胞比例明显升高 ( $P < 0.01$ ); miR-449b inhibitor 组 SKOV3 细胞增殖水平升高 ( $P < 0.01$ ), G0/G1 期细胞比例明显降低 ( $P < 0.01$ )。miR-449b-5p 高表达明显抑制了含有野生型 CCNE2 质粒的荧光素酶活性 ( $P < 0.01$ ), 但对突变型 CCNE2 质粒的荧光素酶活性无影响。与 miR-449b mimic 组相比, miR-449b mimic+ pc-CCNE2 组 SKOV3 细胞生长明显增加 ( $P < 0.01$ ), G0/G1 期细胞比例明显降低 ( $P < 0.01$ )。与 miR-NC 组相比, miR-449b mimic 组裸鼠移植瘤体积明显变小 ( $P < 0.01$ ), 瘤质量明显减轻 ( $P < 0.01$ ), CCNE2 和 Ki67 阳性细胞明显减少 ( $P < 0.01$ )。**结论:** miR-449b-5p 通过靶向 Cyclin E2 抑制卵巢癌细胞生长和细胞周期进展。

**[关键词]** miR-449b-5p; Cyclin E2; 卵巢癌; 生长; 细胞周期

**[中图分类号]** R737.31; R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)02-0143-08

## miR-449b-5p inhibits ovarian cancer cell growth and cell cycle progression by targeting Cyclin E2

LI Lingling, WANG Yujue, YUE Jun, MEI Jie, ZHAO Xiaolan (Department of Obstetrics and Gynecology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610027, Sichuan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect and mechanism of miR-449b-5p on the proliferation of ovarian cancer cells. **Methods:** Cancer tissue and corresponding para-cancerous tissue specimens from 20 patients who underwent surgery in the Department of Obstetrics and Gynecology of Sichuan Provincial People's Hospital from June 2018 to June 2020 were collected for this study; in addition, normal ovarian epithelial cell line (HOSEpiC) and six human cervical cancer cell lines (SKOV3, ES-2, OVCAR-3, HO8910, CaOV-3 and A2780) were also selected. mRNA expressions of miR-449b-5p and CCNE2 in ovarian cancer tissues and cells were detected by qPCR. The plasmids miR-NC, miR-449b-5p mimic, miR-449b-5p inhibitor and pc-CCNE2 were transfected into SKOV3 cells separately or in combination. Cell growth and cell cycle were measured by the CCK-8 method and Flow cytometry, the expression of CCNE2 protein was detected by WB assay, respectively. The targeting relationship between miR-449b-5p and CCNE2 was verified by Dual luciferase reporter assay. miR-449b-5p transfected SKOV3 cells were injected subcutaneously in nude mice to construct xenograft model, and the tumor volume was measured weekly. Nude mice were sacrificed at day 42. The weight of the subcutaneous tumors was weighed by an electronic balance, and the expressions of CCNE2 and Ki67 were detected by immunohistochemistry. **Results:** Compared with normal ovarian tissues and epithelial cell line HOSEpiC, miR-449b expression was significantly down-regulated in human cervical cancer tissues and cell lines SKOV3, ES-2, OVCAR-3, HO8910, CaOV-3 and A2780 ( $P < 0.01$ ). Compared with the Control group, the proliferation of SKOV3 cells in the miR-449b mimic group was significantly reduced ( $P < 0.01$ ) and the cell proportion in G0/G1 phase was significantly increased ( $P < 0.01$ ); while the proliferation of SKOV3 cells in the miR-449b inhibitor group was significantly increased ( $P < 0.01$ ) and the cell proportion in G0/G1 phase was significantly reduced ( $P < 0.01$ ). Over-expression of miR-449b-5p significantly inhibited the luciferase activity of wild type CCNE2 plasmid ( $P < 0.01$ ) but had no effect on the luciferase

**[基金项目]** 四川省卫生和计划生育委员会资助项目(No.18PJ485)。Project supported by Sichuan Health and Family Planning Commission (No.18PJ485)

**[作者简介]** 李玲玲(1986-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事高危产科研究, E-mail: Ellajeff@126.com

**[通信作者]** 赵晓兰(ZHAO Xiaolan, corresponding author), 硕士, 副主任医师, 主要从事围产医学研究, E-mail: zhao\_xiaolan@163.com

activity of the mutant CCNE2 plasmid. Compared with the miR-499b mimic group, the growth of SKOV3 cells in the miR-499b mimic+pc-CCNE2 group was significantly increased ( $P<0.01$ ) and the cell proportion in G0/G1 phase was significantly reduced ( $P<0.01$ ). Compared with the miR-NC group, the tumor volume and weight of nude mice in the miR-499b mimic group were significantly reduced (all  $P<0.01$ ), and the proportion of CCNE2 and Ki67 positive cells was significantly decreased ( $P<0.01$ ).

**Conclusion:** miR-449b-5p inhibits the growth and cell cycle progression of ovarian cancer cells by targeting Cyclin E2.

**[Key words]** miR-449b-5p; Cyclin E2; ovarian cancer; growth; cell cycle

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(2): 143-150. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.02.007]

卵巢癌是女性恶性肿瘤之一, 尽管仅占女性癌症的 3%, 但其致亡人数比女性生殖系统的任何其他癌症都要多, 并且只有 45% 的卵巢癌患者在初诊后可以存活 5 年以上<sup>[1]</sup>。在中国, 卵巢癌是导致癌症相关死亡的第四大原因<sup>[2]</sup>。如此高的病死率与缺乏早期诊断有关。卵巢癌是异质性疾病, 发病早期缺乏敏感性和特异性标志物。虽然治疗技术不断改善, 但卵巢癌患者的 5 年生存率并未得到实质性提高<sup>[3]</sup>。因此, 卵巢癌研究的主要方向包括确定新的早期诊断和治疗靶标以及开发靶向药物。已有证据<sup>[4]</sup>表明, 在肿瘤发展和转移过程存在大量 miRNA 的异常表达, 因此, 揭示 miRNA 在卵巢癌中的潜在作用和机制可以促进对卵巢癌分子生物学的了解, 提供新的治疗和诊断方法。已有研究<sup>[5-7]</sup>表明, miR-499b-5p 在宫颈癌、乳腺癌、鼻咽癌等多种癌症中下调, 其过表达可发挥抑癌作用。WANG 等<sup>[8]</sup>报道, miR-499a 在卵巢癌中低表达, miR-499a 蛋白高表达的卵巢癌患者能获得较好的预后。本文主要探究 miR-449b-5p 对卵巢癌的作用及其机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 组织样品

选取 2018 年 6 月至 2020 年 6 月于四川省人民医院妇产科接受手术的 20 例卵巢癌患者的癌组织和癌旁组织标本, 患者年龄 29~63 岁, 根据 FIGO 分期标准 (2014 年): I 期 1 例、II 期 10 例、III 期 11 例、IV 期 1 例。本研究通过本院研究伦理委员会批准, 并获得患者知情同意。所有受试者均签署了有关临床数据的书面知情同意书。研究经医院研究伦理委员会和临床医学学院审查批准, 并根据《赫尔辛基宣言》的道德准则进行。

### 1.2 主要材料与试剂

正常卵巢上皮细胞系 HOSEpiC 和 6 种人宫颈癌细胞系 SKOV3、ES-2、OVCAR-3、HO8910、CaOV-3 和 A2780 均购自 ATCC, 于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 的青霉素和 100 μg/ml 的链霉素的 RPMI-1640 培养基中, 在 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。

RPMI-1640 培养液购自上海栩冉生物科技有限

公司 (货号 C22400500BT), 胎牛血清、青霉素和链霉素双抗溶液购自上海素尔生物科技有限公司 (货号 16000-044、15140122), miR-NC、miR-499b-5p mimic、miR-499b-5p inhibitor、pc-CCNE2 质粒及各种引物由上海生工生物工程股份有限公司设计并合成, Lipofectamine<sup>2000</sup> 转染试剂购自上海恪敏生物科技有限公司 (货号 11668-027), CCK-8 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司 (货号 CA1210), SYBR-Green PCR 试剂盒购自赛默飞世尔科技公司 (货号 4309155), 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京原平皓生物技术有限公司 (货号 GN201-01), cDNA 逆转录试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司 (货号 GK8030-20), RIPA 裂解缓冲液购自南京海克尔生物科技有限公司 (货号 SBJ-0999), BCA 试剂盒购自上海易色医疗科技有限公司 (货号: BC201), CCNE2 抗体、GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗均购自上海艾博抗生物科技有限公司 (货号: ab40890、ab18602、ab6728), 裸鼠购自四川夏派森医药科技有限公司 [实验动物合格证号: SYXK (川) 2017-203]。

### 1.3 qPCR 检测 miR-449b-5p 与 CCNE2 mRNA 的表达

将所有组织样品剪碎并研磨, 采用 QIAzol 裂解试剂提取总 RNA, 采用 cDNA 逆转录试剂盒合成 cDNA。对于细胞, 将正常卵巢上皮细胞系 HOSEpiC 和 6 种人宫颈癌细胞系 SKOV3、ES-2、OVCAR-3、HO8910、CaOV-3 和 COC1 接种在 6 孔板中, 当细胞生长到近 90% 汇合时, 采用 QIAzol 裂解试剂提取总 RNA, 采用 cDNA 逆转录试剂盒合成 cDNA。按照 SYBR-Green PCR 试剂盒说明书操作, qPCR 检测 miR-449b-5p 的循环条件为 94 °C 20 s 和 60 °C 34 s, 共 40 个循环, 以 U6 为内参。miR-449b-5p 的上游引物序列为 5'-TGGCAGTATTGTTAGCTGGT-3', miR-449b-5p 的下游引物序列为 5'-CGCAAGGATGACACGCAAATTC-3'; U6 的上游引物序列为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3', U6 的下游引物序列为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。检测 CCNE2 的循环条件为 95 °C 15 s 和 60 °C 1 min, 共 40 个循

环, 以 GAPDH 为内参。CCNE2 的上游引物序列为 5'-CCTCCATTGTGAGATAAGGACAG-3', CCNE2 的下游引物序列为 5'-CACAATTAGTGGTGTCTTTCTTTCA-3'; GAPDH 的上游引物序列为 5'-CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3', GAPDH 的下游引物序列为 5'-GCGCCCAATACGACCAAATC-3'。目的基因的相对表达量使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算。

#### 1.4 细胞转染与分组

取对数期 SKOV3 细胞, 接种于 6 孔板 ( $\times 10^6$ /孔), 当细胞生长至 80% 汇合时, 根据 Lipofectamine2000 说明书将 100 nmol/L 的 miR-NC、miR-499b-5p mimic、miR-499b-5p inhibitor、pc-CCNE2 质粒分别或联合转染进入 SKOV3 细胞。根据转染物的不同, 分为 miR-NC、miR-499b-5p mimic、miR-499b-5p inhibitor、pc-CCNE2 和 miR-499b-5p mimic+pc-CCNE2 组, 同时设不转染任何分子的 Control 组。

#### 1.5 CCK-8 法检测 miR-499b-5p 表达对 SKOV3 细胞增殖的影响

取转染后对数期 SKOV3 细胞 100  $\mu$ l 加入 96 孔板 ( $1 \times 10^4$ /孔), 置于 37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  细胞培养箱培养, 在指定的指示时间点 (0、24、48、72、96 h) 将 10  $\mu$ l CCK-8 试剂添加到培养基中, 再培养 2 h, 使用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度 ( $D$ ) 值, 以  $D_{450}$  代表细胞增殖水平。

#### 1.6 流式细胞术检测 miR-499b-5p 表达对 SKOV3 细胞周期的影响

收集各组 SKOV3 细胞并用 70% 乙醇固定 30 min, 然后用冰冷的 PBS 洗涤后离心, 分离细胞, 并在冰上用含 RNase 的 PBS (稀释比例为 1:100) 重悬, 用碘化丙锭染色, 使用流式细胞仪分析细胞周期。

#### 1.7 WB 法检测 miR-499b-5p 表达对 SKOV3 细胞中 CCNE2 蛋白表达的影响

收集各组 SKOV3 细胞, 用 RIPA 裂解液提取总蛋白, 并用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 然后经 SDS-PAGE 分离蛋白后, 用半干转膜仪转移蛋白质至 PVDF 膜, 并用脱脂牛奶室温封闭蛋白 2 h, 再加入兔源的 CCNE2 单克隆一抗 (1:1000), 4  $^{\circ}$ C 封闭过夜, 加入山羊抗兔二抗 (1:2000) 室温封闭 1 h, 滴加 ECL 曝光, 以 GAPDH 为内参, 使用 Quantity One 软件进行分析目标蛋白质的相对表达水平。

#### 1.8 双荧光素酶报告验证 miR-499b-5p 和 CCNE2 的靶向关系

收集生长至对数期的 SKOV3 细胞接种在 24 孔板中, 孵育 24 h 后将 1  $\mu$ g 萤火虫荧光素酶报告基因构建体 PGL3-CCNE2-WT (CCNE2 野生型) 或 PGL3-CCNE2-MUT (CCNE2 突变型) 以及 miR-NC

或 miR-499b-5p mimic 和 PRL-CMV 海藻荧光素酶报告质粒转染细胞, 转染 48 h 后裂解细胞 15 min, 双荧光素酶检测系统测量荧光素酶的相对活性, 用萤火虫荧光素酶活性和肾荧光素酶活性比值表示荧光素酶的相对活性。

#### 1.9 SKOV3 细胞裸鼠移植瘤实验

将裸鼠随机分为 miR-NC 组和 miR-499b-5p mimic 组, 每组 9 只, 在各组裸鼠后肢腹侧皮下分别注射 0.2 ml 的  $1 \times 10^7$  个/ml 转染 miR-NC 或 miR-499b-5p mimic 的 SKOV3 细胞悬液; 接着, 在 SPF 条件下正常饮食饲养。每周检测移植瘤体积, 第 30 天颈椎脱位法处死裸鼠, 完整取出皮下肿瘤, 电子天平称重, 免疫组化检测 CCNE2 和 Ki67 的表达。

#### 1.10 免疫组化检测移植瘤中 CCNE2 和 Ki67 的表达

移植瘤经常规石蜡包埋切片, 脱蜡复水, 过氧化氢脱色, 分别加入鼠抗人 CCNE2 和 Ki67 抗体, 4  $^{\circ}$ C 过夜, 滴加生物素标记二抗并孵育 30 min, 加入 DAB 显色, 经蒸馏水冲洗、苏木精复染、梯度乙醇脱水、二甲苯透明, 封片观察, 统计阳性细胞 (被染为棕褐色) 所占比例。

#### 1.11 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件分析数据, 使用 GraphPad Prism 6.0 软件绘图。所有实验独立重复 3 次, 计量数据经 shapiro-wilk 检验发现均呈正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示; 多组间比较, 除 CCK-8 实验和移植瘤体积采用 Two-Way ANOVA 分析外, 其余进行 One-Way ANOVA 分析, 两组间比较使用 SNK 检验, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

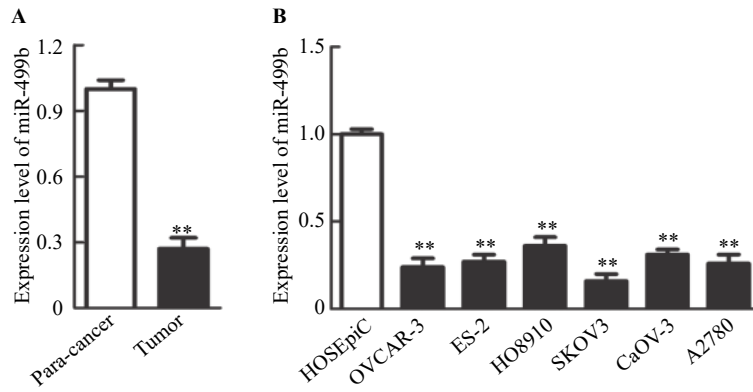
## 2 结果

### 2.1 miR-499b 在卵巢癌中低表达

qPCR 检测结果 (图 1) 显示, 与癌旁组织相比, miR-499b 在卵巢癌组织中的表达明显更低 ( $P < 0.01$ ); miR-499b 在人宫颈癌细胞系 SKOV3、ES-2、OVCAR-3、HO8910、CaOV-3 和 A2780 中的表达显著低于正常卵巢上皮细胞系 HOSEpiC ( $P < 0.01$ )。选择 miR-499b 表达水平最低的 SKOV3 细胞系进行后续实验。

### 2.2 miR-449b-5p 抑制卵巢癌细胞生长和细胞周期进展

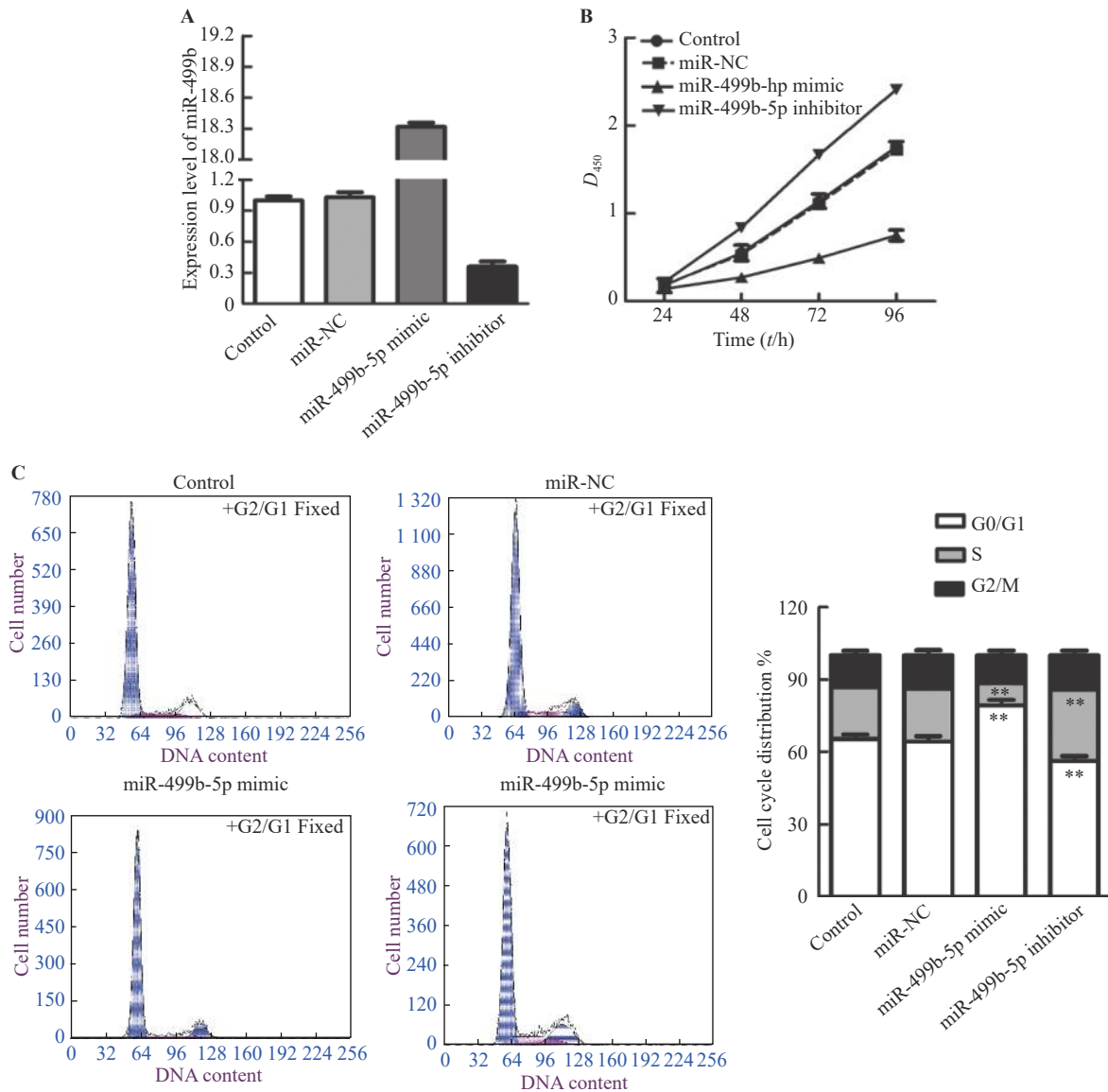
qPCR 检测结果 (图 2A) 显示, 与 Control 组相比, miR-NC 组 SKOV3 细胞中 miR-499b 表达并无变化, miR-499b mimic 组 SKOV3 细胞中 miR-499b 表达明显上调 ( $P < 0.01$ ), miR-499b inhibitor 组 SKOV3 细胞中 miR-499b 表达明显下调 ( $P < 0.01$ ), 表明转染成功, 可进行后续试验。



\*\**P*<0.01 vs para-cancer tissue or HOSEpiC group

图 1 miR-499b 在卵巢癌组织 (A) 和细胞 (B) 中呈低表达

Fig.1 miR-499b was expressed at a lower level in ovarian cancer tissues (A) and cells (B)



\**P*< 0.05, \*\**P*< 0.01 vs Control or miR-NC group

A: The expression level of miR-499b was detected by qPCR; B: Cell proliferation was detected by CCK-8 assay;

C: Cell cycle was detected by Flow cytometry

图 2 miR-449b-5p 对 SKOV3 细胞生长和细胞周期进展的影响

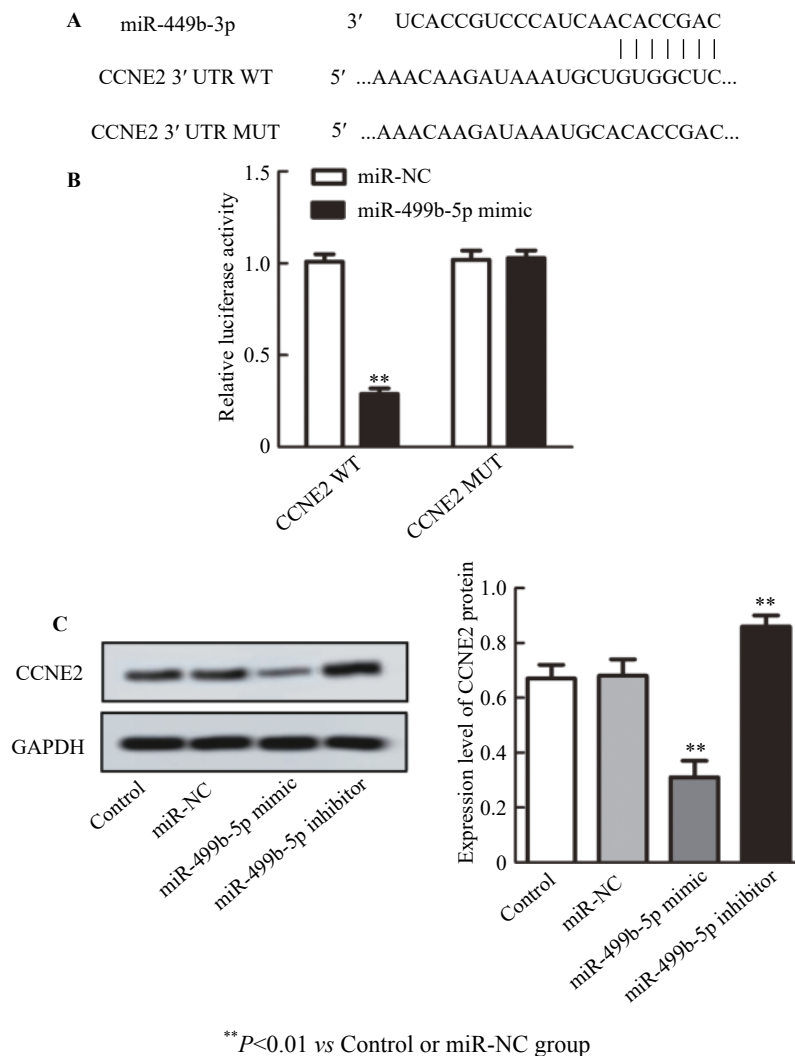
Fig.2 Effects of miR-449b-5p on growth and cell cycle progression of SKOV3 cells

CCK-8 实验检测结果 (图 2B) 显示, 随着时间的增加, 各组卵巢癌细胞增殖水平的差异逐渐增大, 在 96 h 时, 与 Control 组相比, miR-NC 组 SKOV3 细胞增殖水平无显著差异, miR-499b mimic 组 SKOV3 细胞的增殖明显受到抑制 ( $P < 0.01$ ), miR-499b inhibitor 组细胞增殖水平明显升高 ( $P < 0.01$ )。流式细胞术检测结果 (图 2C) 显示, 与 Control 组相比, miR-NC 组 SKOV3 细胞周期进展无显著差异, miR-499b mimic 组中处于 G0/G1 期的 SKOV3 细胞比例显著增加 ( $P < 0.01$ ), miR-499b inhibitor 处于 G0/G1 期的细胞比例显著减少 ( $P < 0.01$ )。

### 2.3 miR-449b-5p 靶向下调 CCNE2 基因表达

通过 TargetScan 数据库进行预测, 结果如图 3A

所示, miR-499b-5p 与 CCNE2 基因的 3'UTR 区存在结合位点。通过双荧光素酶报告基因实验验证靶向关系, 结果如图 3B 所示, 与 Control 组相比, miR-499b-5p 过表达组 SKOV3 细胞内含有野生型 CCNE2 质粒的荧光素酶活性受到明显抑制 ( $P < 0.01$ ), 但对突变型 CCNE2 质粒的荧光素酶活性无影响。WB 检测结果 (图 3C) 显示, 与 Control 组相比, miR-NC 组 SKOV3 细胞中 CCNE2 蛋白表达无显著差异, miR-499b mimic 组 SKOV3 细胞 CCNE2 蛋白表达明显下调 ( $P < 0.01$ ), miR-499b inhibitor 组 SKOV3 细胞 CCNE2 蛋白表达明显上调 ( $P < 0.01$ )。



A: miR-451 target was predicted by TargetScan database; B: The targeting relationship was verified by the Dual luciferase reporter gene experiment; C: The expression level of CCNE2 protein was detected by WB assay

图 3 miR-449b-5p 靶向下调 CCNE2 的表达

Fig.3 miR-449b-5p targetedly down-regulated the expression of CCNE2

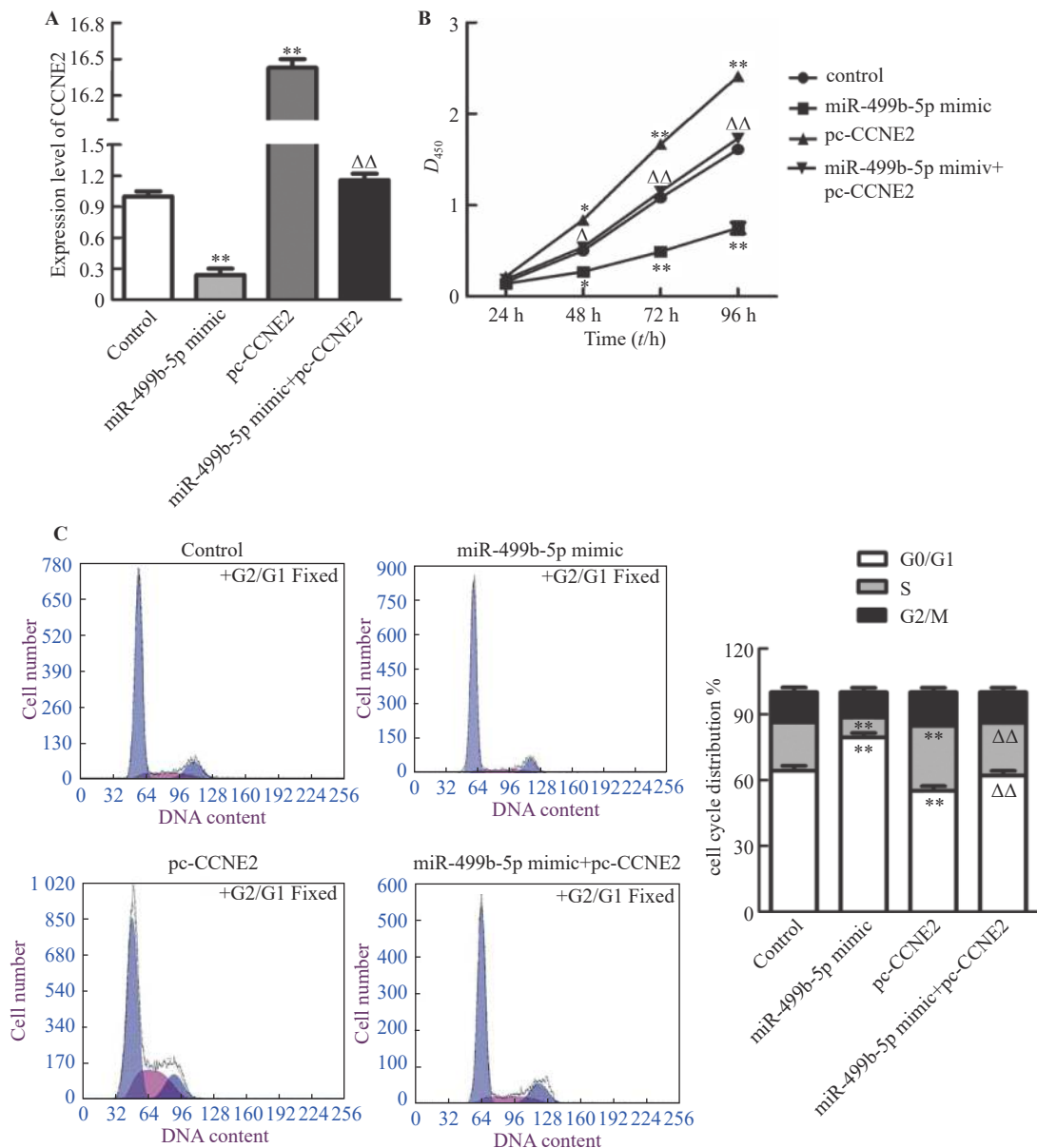
### 2.4 miR-449b-5p 靶向 CCNE2 抑制卵巢癌细胞生长和细胞周期进展

qPCR 检测结果 (图 4A) 显示, 与 Control 组

相比, miR-499b mimic 组 SKOV3 细胞中 CCNE2 mRNA 表达明显下调 ( $P < 0.01$ ), pc-CCNE2 组 SKOV3 细胞中 CCNE2 mRNA 表达明显上调 ( $P < 0.01$ );

与 miR-499b mimic 组相比, miR-499b mimic+ pc-CCNE2 组 SKOV3 细胞中 CCNE2 mRNA 表达

明显上调 ( $P < 0.01$ ); 表明转染成功, 可进行后续试验。



\*\* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs miR-499b mimic group

A: The expression level of CCNE2 was detected by qPCR; B: Cell proliferation was detected by CCK-8 assay;

C: Cell cycle was detected by Flow cytometry

图 4 miR-449b-5p 靶向 CCNE2 抑制 SKOV3 细胞生长和细胞周期进展

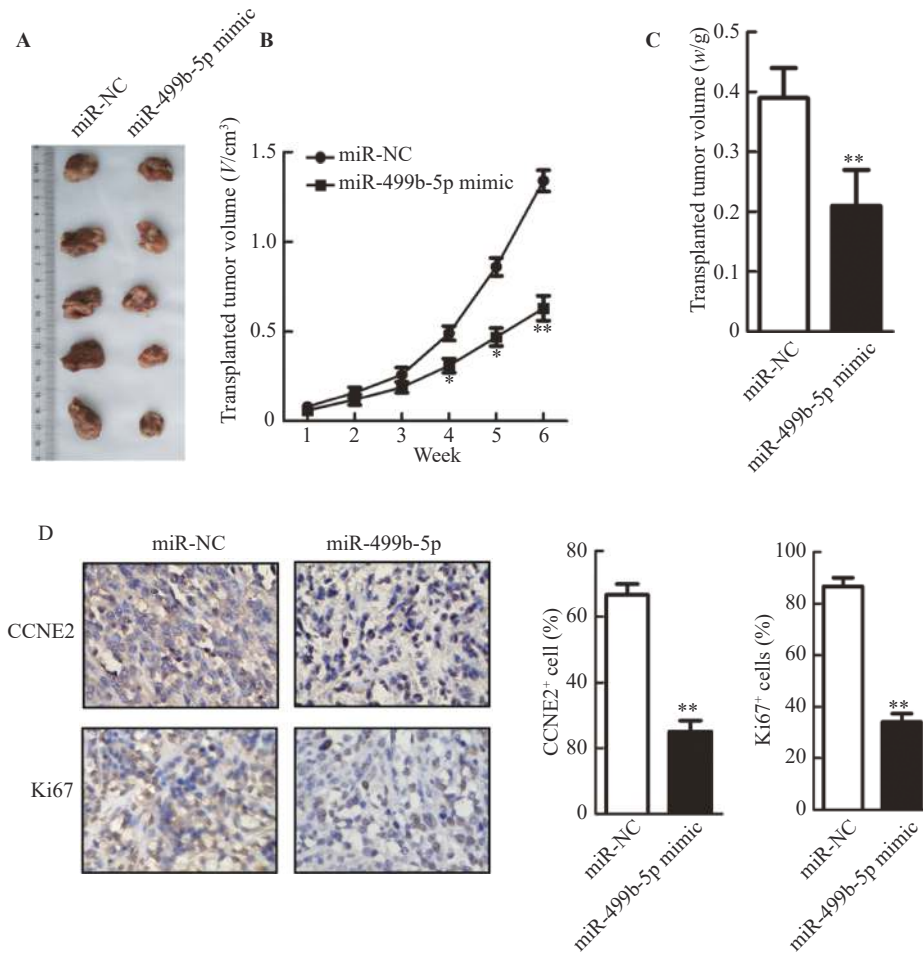
Fig.4 miR-449b-5p inhibited the growth and cell cycle progression of SKOV3 cells by targeting CCNE2

CCK-8 实验检测结果 (图 4B) 显示, 从 48 h 起, 与 Control 组相比, miR-499b mimic 组 SKOV3 细胞增殖水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), pc-CCNE2 组 SKOV3 细胞增殖明显增加 ( $P < 0.05$ ), 而 miR-499b mimic+ pc-CCNE2 组增殖水平无显著差异; 与 miR-499b mimic 组相比, miR-499b mimic+ pc-CCNE2 组 SKOV3 细胞生长明显增加 ( $P < 0.01$ )。流式细胞术检测结果 (图 4C) 显示, 与 Control 组相比, miR-499b mimic 组 G0/G1 期 SKOV3 细胞比例明显升高 ( $P < 0.01$ ), pc-CCNE2 组 G0/G1 期细胞明显减少 ( $P < 0.01$ ); 与

miR-499b mimic 组相比, miR-499b mimic+ pc-CCNE2 组 G0/G1 期细胞明显减少 ( $P < 0.01$ )。

### 2.5 miR-449b-5p 抑制 SKOV3 细胞裸鼠移植瘤的生长

观察 SKOV3 细胞裸鼠移植瘤的生长, 结果如图 5 所示, 与 miR-NC 组相比, miR-499b mimic 组移植瘤体积明显缩小 ( $P < 0.01$ ), 瘤质量明显减轻 ( $P < 0.01$ ), CCNE2 和 Ki67 阳性细胞所占比例明显减少 ( $P < 0.01$ )。



\*\* $P < 0.01$  vs miR-NC group

A: Picture of transplanted tumors; B: Volume of transplanted tumors; C: Weight of transplanted tumors; D: Expressions of CCNE2 and Ki67 in transplanted tumor were detected by immunohistochemistry (400 $\times$ )

图 5 miR-449b-5p 抑制 SKOV3 移植瘤生长

Fig.5 miR-449b-5p inhibited the growth of SKOV3 xenografts

### 3 讨论

miRNA 参与细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和血管生成等多种生理活动。已有研究表明,在卵巢癌发展过程中有大量 miRNA 异常表达,这些 miRNA 在卵巢癌的发展中扮演着抑癌或致癌的角色。如,miR-126-3p、miR-206 等抑制卵巢癌的发展<sup>[9-10]</sup>; miR-221、miR-590-3p 等促进卵巢癌的发展<sup>[11-12]</sup>。已有研究<sup>[8]</sup>报道 miR-499 在卵巢癌中低表达,miR-499 高表达的卵巢癌患者能获得较好的预后,因此,预测 miR-449b-5p 在卵巢癌中发挥抑癌作用。细胞恶性生长是肿瘤细胞的一大特征,有效遏制细胞的恶性生长有利于肿瘤的治疗。有效诱导肿瘤细胞周期阻滞能够抑制肿瘤的发展。研究<sup>[13]</sup>表明,miR-337-3p 的异位表达抑制 EOC 细胞 G0/G1 期的增殖并诱导凋亡和细胞周期停滞。miR-449b 和 miR-34c 使高恶性卵巢癌细胞系 SKOV3-ipl 发生细胞周期阻滞,CDK6、CDC25A 和 CyclinA 表达均下调<sup>[14]</sup>。与前人研究结果相一致,在本研究中发现,miR-449b-5p 在

卵巢癌细胞中表达明显降低。除此之外,本文还发现,miR-449b-5p 表达的恢复能够明显抑制卵巢癌细胞的生长,并抑制细胞周期进展。

miRNA 通过结合其靶 mRNA 的 3'非翻译区来转录后调节基因表达,从而发挥抑癌或致癌作用,如过表达 miR-449b-5p 通过靶向 VAV3 抑制非小细胞肺癌的增殖和转移<sup>[15]</sup>。为了更好地了解 miR-449b-5p 对卵巢癌的作用机制,本研究使用 TargetScan 数据库预测 miR-449b-5p 靶基因,发现 miR-449b-5p 与细胞周期蛋白 E2 (Cyclin E2, CCNE2) 3'UTR 区存在结合位点,并通过双荧光素酶报告实验验证了该靶向关系,并发现 miR-449b-5p 高表达可下调 CCNE2 表达。CCNE2 是细胞周期蛋白 E 家族的成员,其主要功能是调节细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinases, CDK)。CCNE2 是 CDK2 的调节亚基,可通过 CDK2 的结合和 Rb 蛋白的磷酸化促使细胞从 G0/G1 过渡到 S 期<sup>[16]</sup>。CCNE2 的下调可以引起 PDL 细胞周期在 G1 期阻滞<sup>[17]</sup>。已有众多研究表明,

miRNA 可通过结合 CCNE2 来调节细胞周期, 进而抑制肿瘤的发展, 如 miR-383 通过靶向 CCNE2 抑制胃癌细胞的细胞周期进展和增殖<sup>[18]</sup>, miR-25 通过 CCNE2 调控小细胞肺癌细胞的发育和细胞周期<sup>[19]</sup>。XIE 等<sup>[20]</sup>报道 CCNE2 高表达与卵巢癌预后差呈正相关。本研究发现, CCNE2 高表达促进卵巢癌的生长和细胞周期进展, 且 CCNE2 高表达能够逆转 miR-499b-5p 高表达对卵巢癌细胞的生长和细胞周期进展的抑制作用。综上, miR-449b-5p 通过靶向下调 Cyclin E2 来抑制卵巢癌细胞生长和细胞周期进展。

相比单一的外部环境, 生物体内环境是及其复杂多变的。为了更好的了解 miR-449b-5p 对卵巢癌的作用, 本文进行了裸鼠体内实验。发现过表达 miR-499b-5p 明显减小裸鼠移植瘤体积, 减轻移植瘤质量, 减少 CCNE2 和 Ki67 阳性细胞所占比率, 说明在体内 miR-449b-5p 过表达抑制卵巢癌发展, 其与下调 Cyclin E2 来抑制卵巢癌细胞生长和细胞周期进展有关。

综上所述, miR-449b-5p 通过靶向下调 Cyclin E2 来抑制卵巢癌细胞生长和细胞周期进展, 这说明 miR-449b-5p 和 Cyclin E2 是卵巢癌的潜在治疗靶标, 但其更为详细的分子通路机制还有待进一步的研究。

## 参考文献

- [1] 徐炼, 王巍, 何英, 等. 卵巢巢黄囊瘤46例临床病理分析[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2018, 49(4): 680-682. DOI: 10.13464/j.scuxbyxb.2018.04.041.
- [2] 王静, 张帆, 吴琳娜, 等. miR-145调控CCND2蛋白影响卵巢癌细胞的迁移和侵袭[J]. *医学分子生物学杂志*, 2019, 16(2): 115-119, 125. DOI: 10.3870/j.issn.1672-8009.2019.02.003.
- [3] 陈杰, 佟玲, 朱亦峰. 龙胆苦苷对卵巢癌细胞株SKOV3氧化应激损伤和细胞凋亡的影响及机制研究[J]. *医学分子生物学杂志*, 2019, 16(2): 126-131. DOI: 10.3870/j.issn.1672-8009.2019.02.005.
- [4] MARKOWSKA A, SAJDAK S. Role of cancer stem cells and microRNA in resistance to chemotherapy in patients with ovarian cancer[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2017, 38(2): 181-183.
- [5] CHENG L, SHI X, HUO D, et al. Mir-449b-5p regulates cell proliferation, migration and radioresistance in cervical cancer by interacting with the transcription suppressor foxp1 [J/OL]. *Eur J Pharm*, 2019, 856(5): 172399 [2020-06-12]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014299919303383>. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.05.028.
- [6] JIANG J, YANG X, HE X, et al. MicroRNA-449b-5p suppresses the growth and invasion of breast cancer cells via inhibiting CREPT-mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J/OL]. *Chem Biol Interact*, 2019, 302: 74-82 [2020-06-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30738779/>. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.02.004.
- [7] YIN W, SHI L, MAO Y. MicroRNA-449b-5p suppresses cell proliferation, migration and invasion by targeting TPD52 in nasopharyngeal carcinoma[J]. *J Biochem*, 2019, 166(5): 433-440. DOI: 10.1093/jb/mvz057.
- [8] 王秋宇, 李晓翔, 朱军义. MiR-449a和PLAGL2在卵巢癌中的表达关系及临床意义[J]. *医学研究杂志*, 2019, 48(3): 105-110. DOI: 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.03.025.
- [9] XIANG G, CHENG Y. MiR-126-3p inhibits ovarian cancer proliferation and invasion via targeting PLXNB<sub>2</sub>[J]. *Reprod Biol*, 2018, 18(3): 218-224. DOI: 10.1016/j.repbio.2018.07.005.
- [10] YU X, ZHANG X, WANG G, et al. miR-206 as a prognostic and sensitivity biomarker for platinum chemotherapy in epithelial ovarian cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 534-547. DOI: 10.1186/s12935-020-01623-y.
- [11] 杜小航, 石钢, 吕东昊, 等. miRNA-221在EMS组织及间质细胞中的表达及对细胞增殖的影响[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2018, 49(4): 546-550. DOI: 10.13464/j.scuxbyxb.2018.04.008.
- [12] SALEM M, SHAN Y, BERNAUDO S, et al. miR-590-3p targets cyclin G2 and FOXO3 to promote ovarian cancer cell proliferation, invasion, and spheroid formation[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1-13. DOI: 10.3390/ijms20081810. DOI: 10.3390/ijms20081810.
- [13] ZHANG Z, ZHANG L, WANG B, et al. MiR-337-3p suppresses proliferation of epithelial ovarian cancer by targeting PIK3CA and PIK3CB [J/OL]. *Cancer letters*, 2020, 469: 54-67 [2020-06-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31629932/>. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.10.021.
- [14] 马丽萍, 李娜, 何湘君, 等. miR-449b和miR-34c对卵巢癌细胞SKOV3-ipl周期相关蛋白的下调及细胞周期阻滞作用[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2011, 43(1): 129-133. DOI: 10.3969/j.issn.1671-167X.2011.01.028.
- [15] LI M, ZHANG S, WU N, et al. Overexpression of miR-499-5p inhibits non-small cell lung cancer proliferation and metastasis by targeting VAV3[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(14): 23100. DOI: 10.1038/srep23100.
- [16] KUMARI S, PUNEET, PRASAD S B, et al. Cyclin D1 and cyclin E2 are differentially expressed in gastric cancer[J]. *Med Oncol*, 2016, 33(5): 40-52. DOI: 10.1007/s12032-016-0754-8.
- [17] WU L, YANG K, GUI Y, et al. Nicotine-upregulated miR-30a arrests cell cycle in G1 phase by directly targeting CCNE2 in human periodontal ligament cells[J]. *Biochem Cell Biol*, 2020, 98(3): 354-361. DOI: 10.1139/bcb-2019-0156.
- [18] ZHU C, HUANG Q, ZHU H. miR-383 inhibited the cell cycle progression of gastric cancer cells via targeting cyclin E2[J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(8): 849-856. DOI: 10.1089/dna.2019.4624.
- [19] ZHAO Z, LIU J, WANG C, et al. MicroRNA-25 regulates small cell lung cancer cell development and cell cycle through cyclin E2[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11): 7726-7734.
- [20] XIE L, LI T, YANG L H. E2F2 induces MCM4, CCNE2 and WHSC1 upregulation in ovarian cancer and predicts poor overall survival[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(9): 2150-2156.

[收稿日期] 2020-08-11

[修回日期] 2021-02-13

[本文编辑] 黄静怡