

miR-425-5p调节PTEN/PI3K/AKT轴对卵巢癌细胞顺铂敏感性的影响

宋玉芳 张前 刘英杰 刘芳*
(唐山市妇幼保健院妇科, 唐山 063000)

摘要 该文探究微小RNA-425-5p(miR-425-5p)调节磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog, PTEN)/磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)轴对卵巢癌(ovarian cancer, OC)细胞顺铂(cisplatin, DDP)敏感性的影响。将人OC耐药细胞A2780/DDP随机分为DDP组、DDP+miR-425-5p抑制剂(inhibitor)组、DDP+阴性对照(NC) inhibitor组、DDP+miR-425-5p inhibitor+过氧钒(PIC, PTEN抑制剂)组,另设A2780细胞为对照组(Control组)。CCK-8法检测各组细胞的增殖能力。细胞划痕实验检测各组细胞的迁移能力。Transwell实验检测各组细胞的侵袭能力。流式细胞术测定各组细胞的凋亡率。荧光实时定量PCR法测定各组细胞中miR-425-5p以及PTEN、PI3K和AKT mRNA的表达情况。Western blot法测定各组细胞中PTEN/PI3K/AKT轴相关蛋白的表达情况。双荧光素酶报告基因实验检测miR-425-5p与PTEN的靶向关系。结果显示,与Control组相比,DDP组细胞增殖能力(48 h、72 h)、迁移率、细胞侵袭数目显著上升($P<0.05$),细胞凋亡率显著下降($P<0.05$)。与DDP组相比,DDP+miR-425-5p inhibitor组细胞增殖能力(48 h、72 h)、迁移率、细胞侵袭数目以及miR-425-5p表达水平、PI3K和AKT的mRNA表达水平和蛋白磷酸化水平显著下降($P<0.05$),细胞凋亡率、PTEN mRNA和蛋白表达量显著提高($P<0.05$)。PIC可显著减弱miR-425-5p敲低对A2780细胞DDP敏感性的影响($P<0.05$)。miR-425-5p与PTEN存在靶向关系。下调miR-425-5p可能通过激活PTEN/PI3K/AKT通路,增加OC细胞对DDP的敏感性。

关键词 微小RNA-425-5p; PTEN/PI3K/AKT; 卵巢癌; 顺铂; 敏感性

Influence of miR-425-5p on Cisplatin Sensitivity of Ovarian Cancer Cells by Regulating the PTEN/PI3K/AKT Axis

SONG Yufang, ZHANG Qian, LIU Yingjie, LIU Fang*

(Department of Gynecology, Tangshan Maternal and Child Health Hospital, Tangshan 063000, China)

Abstract This article explored the influence of miR-425-5p (microRNA-425-5p) on DDP (cisplatin) sensitivity of OC (ovarian cancer) cells by regulating PTEN (phosphatase and tensin homolog)/PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/AKT (protein kinase B) axis. Human OC resistant cells A2780/DDP were randomly divided into DDP group, DDP+miR-425-5p inhibitor group, DDP+NC (negative control) inhibitor group, DDP+miR-425-5p inhibitor+PIC (vanadium peroxide, PTEN inhibitor) group, A2780 cells were used as Control group. The cell proliferation ability of each group was detected by CCK-8 method. The cell migration ability of each group was detected

收稿日期: 2023-06-02

接受日期: 2023-07-10

河北省医学科学研究课题计划(批准号: 20201482)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13831563910, E-mail: jfqr52@163.com

Received: June 2, 2023

Accepted: July 10, 2023

This work was supported by the Hebei Medical Science Research Project (Grant No.20201482)

*Corresponding author. Tel: +86-13831563910, E-mail: jfqr52@163.com

by cell scratch assay. The invasive ability of cells in each group was detected by Transwell assay. The apoptosis rate of each group was analyzed by flow cytometry. The expression of miR-425-5p, as well as *PTEN*, *PI3K* and *AKT* mRNA in each group of cells was determined by real-time quantitative PCR. The expression of PTEN/PI3K/AKT axis-related proteins in each group of cells was determined by Western blot. The dual-luciferase gene reporter assay was used to detect the targeting relationship between miR-425-5p and *PTEN*. The results showed that, compared with Control group, the cell proliferation ability (48 h, 72 h), migration rate and cell invasion number in DDP group were significantly increased ($P<0.05$), and the apoptosis rate was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the DDP group, the cell proliferation ability (48 h, 72 h), migration rate, cell invasion number, miR-425-5p expression level, PI3K and AKT mRNA expression and protein phosphorylation levels in the DDP+miR-425-5p inhibitor group were significantly decreased ($P<0.05$), and the apoptosis rate, PTEN mRNA and protein expression were significantly increased ($P<0.05$). PIC significantly attenuated the effect of miR-425-5p knockdown on DDP sensitivity of A2780 cells ($P<0.05$). There was a targeting relationship between miR-425-5p and *PTEN*. Down-regulation of miR-425-5p may increase the sensitivity of OC cells to DDP by activating the PTEN/PI3K/AKT pathway.

Keywords microRNA-425-5p; PTEN/PI3K/AKT; ovarian cancer; cisplatin; sensitivity

卵巢癌(ovarian cancer, OC)是女性恶性肿瘤中病死率较高的一种,全球每年约有14万女性死于卵巢癌^[1]。目前临床治疗OC的主要方法有化学药物治疗、手术治疗、放射治疗^[2]。化学药物具有优异的抗肿瘤活性,但其副作用也较为严重,且OC细胞耐药性给提高肿瘤临床治疗带来了障碍和挑战。因此克服化疗的耐药,是OC治疗中需要攻克的难点和重点。顺铂(cisplatin, DDP)是治疗OC的一种常用化学药物,其作用机制是与DNA形成化合物诱导细胞毒性,抑制肿瘤细胞的生长与增殖^[3]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一种长度为19~25个核苷酸的非编码RNA,研究证明miRNA与OC化疗耐药密切相关,已有多种miRNA被发现对OC化疗的敏感性具有调控作用和影响^[4-5]。徐丽秀等^[6]研究发现,miR-181a在抑制OC细胞对DDP的耐药性中具有一定作用。研究表明miR-425-5p在OC患者中明显上调,与OC患者不良预后密切相关,沉默miR-425-5p在体外可抑制OC细胞的增殖、迁移和侵袭^[7]。然而,miR-425-5p对OC耐药的影响尚不明确。PTEN能够负向调控PI3K/AKT的信号转导,在细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡等生物学过程中发挥着重要的作用^[8]。此外,PTEN下调与OC化疗敏感性密切相关^[9]。生物信息学预测显示,PTEN是miR-425-5p的潜在靶点,但miR-425-5p能否通过PTEN/PI3K/AKT轴影响OC对DDP的耐药性尚不清楚。本研究以OC细胞A2780及OC耐药细胞A2780/DDP为研究对象,探究miR-425-5p调节PTEN/PI3K/AKT轴对OC细胞顺铂敏感

性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞株 人OC细胞A2780及OC耐药细胞A2780/DDP购自中国科学院上海细胞库。人胚胎肾HEK293T细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞库。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、DMEM高糖培养基、胰蛋白酶、PBS等购自美国Gibco公司; DDP购自美国Sigma公司; RIPA裂解液、Trizol试剂购自美国ThermoFisher公司; CCK-8试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Transwell小室购自美国Corning公司; PTEN、PI3K、AKT、GAPDH一抗及其相应二抗购自英国Abcam公司; miR-425-5p inhibitor、阴性对照(NC) inhibitor、miR-425-5p模拟物(mimic)和NC mimic购自广州锐博生物科技有限公司。PIC购自美国Merck公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将A2780和A2780/DDP细胞用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养,在37℃、5% CO₂的细胞培养箱中进行培养,每2天更换1次新鲜培养基。当细胞融合至80%左右时进行传代,传代3次后取生长对数期的细胞用于实验。

1.2.2 细胞分组与转染 将A2780/DDP细胞随机分为DDP组、DDP+miR-425-5p抑制剂(inhibitor)组、

DDP+阴性对照(NC) inhibitor组、DDP+miR-425-5p inhibitor+过氧钒(PIC, PTEN抑制剂, 10 nmol/L^[10])组, 另设A2780细胞为对照组(Control组)。各组均加入DDP(16 μ mol/L)或相应药物^[11]。将A2780/DDP细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种到无菌6孔板上, 37 °C下孵育过夜。次日进行转染, 将miR-425-5p inhibitor、NC inhibitor转染到A2780/DDP细胞中。培养24 h后, 进行后续实验。

1.2.3 CCK-8法检测细胞增殖能力 取1.2.1中的对数生长期细胞按1.2.2进行相应处理, 之后将细胞培养在96孔板中, 细胞密度为 5×10^4 个/孔。分别在24 h、48 h和72 h加入10 μ L CCK-8试剂, 在37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中继续培养4 h后, 使用酶标仪在450 nm波长处测定每孔的吸光度(D)值。

1.2.4 划痕实验检测细胞迁移情况 将对数生长期A2780和A2780/DDP细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种到6孔板中, 待细胞融合至90%时, 按1.2.2方法进行处理。用无菌的100 μ L移液器在细胞板上垂直进行划痕。用PBS洗涤细胞后继续用无血清培养基培养48 h。在光镜下观察并记录0 h、48 h时细胞的迁移距离, 并计算迁移率。迁移率=[(0 h的划痕距离-48 h的划痕距离)/0 h的划痕距离] $\times 100\%$ 。

1.2.5 Transwell实验检测细胞侵袭情况 取对数生长期的A2780和A2780/DDP细胞并按1.2.2中方法进行处理。培养24 h后加入胰蛋白酶消化并收集细胞, 将细胞接种在基质胶包被的Transwell小室上室中, 调整细胞密度为 2.5×10^4 个/孔, 接种的细胞悬液的体积为100 μ L。下室中加入600 μ L含有10%胎牛血清的DMEM培养基。37 °C下孵育24 h后取出小室, 37 °C下用4%多聚甲醛固定细胞20 min、结晶紫染色液染色30 min后, 用PBS洗涤以去除多余的染色液, 用棉签轻轻将小室上层的非侵入细胞擦去。在光学显微镜下观察穿过膜的细胞, 每个小室随机选取6个视野进行拍照, 并进行细胞计数。

1.2.6 细胞凋亡分析 收集1.2.2中处理并培养24 h后的各组细胞, 用PBS洗涤。加入100 μ L结合缓冲液、5 μ L的FITC和5 μ L的PI染液, 37 °C下于暗处孵育20 min。加入100 μ L的结合缓冲液重悬细胞, 用流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.2.7 qRT-PCR法测定细胞miR-425-5p以及PTEN、PI3K和AKT mRNA的表达水平 加入Trizol试剂提取1.2.2中处理并培养24 h后的各组细胞总RNA,

使用SYBR Green RT-PCR试剂盒将RNA逆转录为cDNA, 并进行扩增。引物序列设计如下: miR-425-5p上游引物5'-CAG CAG CAA TTC ATG T-3', 下游引物5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3'; PTEN上游引物5'-TGG ATT CGA CTT AGA CTT GAC CT-3', 下游引物5'-GCG GTG TCA TAA TGT CTC TCA G-3'; PI3K上游引物5'-AAC ACA GAA GAC CAA TAC TC-3', 下游引物5'-TTC CCA TCT ACC ACT AC-3'; AKT上游引物5'-GTG GCA AGA TGT GAT GCG AG-3', 下游引物5'-CTG GCT GAG TAG GAG AAC-3'; GAPDH上游引物5'-TTG CAA CCG GGA AGG AAA TG-3', 下游引物5'-GGA CTG TGG TCA TGA GTC CT-3'; U6上游引物5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 下游引物5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-425-5p以及PTEN、PI3K和AKT mRNA的相对表达量。

1.2.8 Western blot检测细胞中PTEN、PI3K和AKT蛋白的表达情况 取1.2.2中处理并培养24 h后的各组细胞, 将RIPA裂解液加入到细胞中提取总蛋白, 于冰上裂解30 min, 离心(4 °C、12 000 $\times g$) 5 min后获得细胞总蛋白。用BCA法对蛋白进行定量, 取60 μ g蛋白质进行SDS-PAGE电泳, 经转膜、5%脱脂奶粉室温封闭2 h后, 加入PTEN(1:2 000)、PI3K(1:2 000)、p-PI3K(1:2 000)、AKT(1:1 000)和p-AKT(1:1 000)一抗进行稀释, 在4 °C下孵育过夜。PBS洗涤后加入相应二抗(1:10 000)室温下共同孵育1 h。加入ECL显色剂对蛋白条带进行显色, 用凝胶成像仪成像后, 检测目标蛋白条带的灰度值。

1.2.9 双荧光素酶报告基因实验检测miR-425-5p与PTEN的关系 采用TargetScan网站(https://www.targetscan.org/vert_72/)预测miR-425-5p与PTEN的结合位点, 用双荧光素酶报告基因实验来验证其靶向关系。构建PTEN野生型质粒(PTEN-WT)和突变型质粒(PTEN-MUT), 将PTEN-WT与PTEN-MUT分别与NC mimic或miR-425-5p mimic共转染于HEK293T细胞, 转染48 h后检测荧光素酶活性。

1.2.10 统计学分析 本研究实验数据采用GraphPad Prism 7.0软件进行分析统计, 以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间数据比较采用LSD-*t*法, 多组间数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-425-5p在A2780和A2780/DDP细胞中的表达情况

与A2780细胞相比, A2780/DDP细胞中miR-425-5p的表达水平显著升高(2.76 ± 0.20 比 1.02 ± 0.13 , $P < 0.05$)。

2.2 miR-425-5p对各组细胞增殖能力的影响

与Control组相比, DDP组细胞(48 h、72 h) D_{450} 值显著上升($P < 0.05$)。与DDP组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor组细胞(48 h、72 h) D_{450} 值显著下降($P < 0.05$), DDP+NC inhibitor组细胞(24 h、48 h、72 h) D_{450} 值无显著性差异($P > 0.05$); 与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor+PIC组细胞(48 h、72 h) D_{450} 值显著上升($P < 0.05$)(表1)。

2.3 miR-425-5p对各组细胞迁移能力的影响

与Control组相比, DDP组细胞迁移率显著上升($P < 0.05$)。与DDP组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor组细胞迁移率显著下降($P < 0.05$), DDP+NC inhibitor组细胞凋亡率无显著性差异($P > 0.05$); 与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor+PIC组细胞迁移率显著上升($P < 0.05$)(表2和图1)。

2.4 miR-425-5p对各组细胞侵袭数目的影响

与Control组相比, DDP组细胞侵袭数目显著上升($P < 0.05$)。与DDP组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor组细胞侵袭数目显著下降($P < 0.05$), DDP+NC inhibitor组细胞侵袭数目无显著性差异($P > 0.05$); 与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor+PIC组细胞侵袭数目显著上升($P < 0.05$)(表3和图2)。

2.5 miR-425-5p对各组细胞凋亡的影响

与Control组相比, DDP组细胞凋亡率显著下降($P < 0.05$)。与DDP组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor组细胞凋亡率显著上升($P < 0.05$), DDP+NC inhibitor组细胞凋亡率无显著性差异($P > 0.05$); 与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor+PIC组细胞凋亡率显著下降($P < 0.05$)(图3和表4)。

2.6 各组细胞中miR-425-5p以及PTEN、PI3K和AKT mRNA的表达量比较

与Control组相比, DDP组细胞miR-425-5p、PTEN、PI3K和AKT表达量无显著性差异($P > 0.05$)。与DDP组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor组细胞miR-425-5p、PI3K和AKT表达量显著降低($P < 0.05$),

表1 各组细胞增殖能力的比较

Table 1 Comparison of cell proliferation capacity in each group

组别 Group	D_{450}		
	24 h	48 h	72 h
Control	0.26 ± 0.03	0.44 ± 0.05	0.62 ± 0.06
DDP	0.28 ± 0.03	$0.57 \pm 0.05^*$	$0.78 \pm 0.07^*$
DDP+miR-425-5p inhibitor	0.24 ± 0.02	$0.36 \pm 0.03^{\#}$	$0.58 \pm 0.05^{\#}$
DDP+NC inhibitor	0.25 ± 0.04	0.60 ± 0.07	0.74 ± 0.07
DDP+miR-425-5p inhibitor+PIC	0.22 ± 0.03	$0.52 \pm 0.05^{\&}$	$0.73 \pm 0.08^{\&}$

* $P < 0.05$, 与Control组相比; $^{\#}P < 0.05$, 与DDP组相比; $^{\&}P < 0.05$, 与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比。

* $P < 0.05$ compared with Control group; $^{\#}P < 0.05$ compared with DDP group; $^{\&}P < 0.05$ compared with DDP+miR-425-5p inhibitor group.

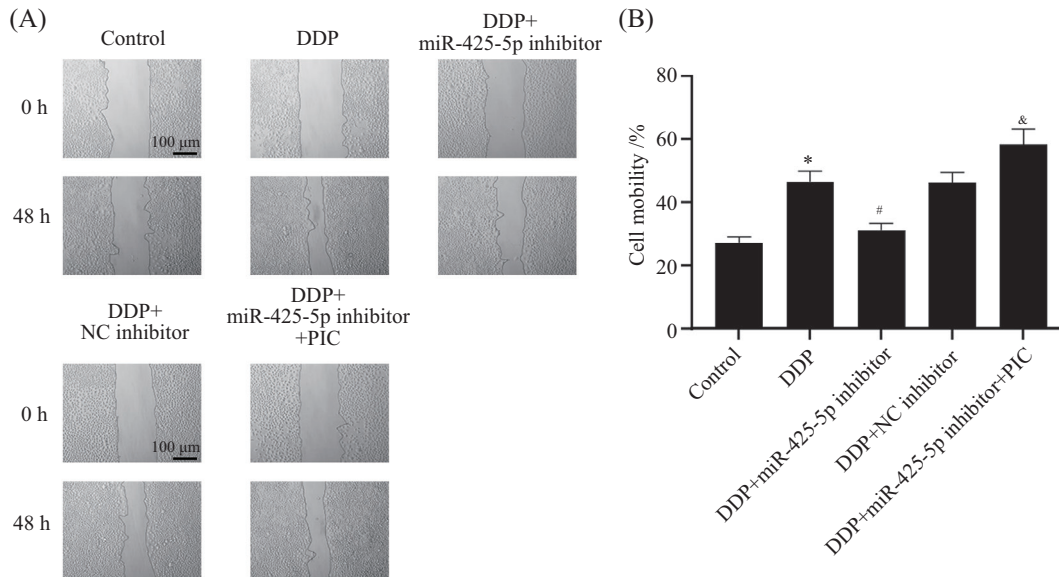
表2 各组细胞迁移率的比较

Table 2 Comparison of cell mobility in each group

组别 Group	细胞迁移率/% Cell migration rate /%
Control	27.25 ± 1.85
DDP	$46.53 \pm 3.38^*$
DDP+miR-425-5p inhibitor	$31.24 \pm 2.03^{\#}$
DDP+NC inhibitor	46.28 ± 3.25
DDP+miR-425-5p inhibitor+PIC	$58.19 \pm 4.96^{\&}$

* $P < 0.05$, 与Control组相比; $^{\#}P < 0.05$, 与DDP组相比; $^{\&}P < 0.05$, 与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比。

* $P < 0.05$ compared with the Control group; $^{\#}P < 0.05$ compared with DDP group; $^{\&}P < 0.05$ compared with DDP+miR-425-5p inhibitor group.



A: 划痕实验的代表性图片; B: 细胞迁移率; * $P<0.05$, 与Control组相比; # $P<0.05$, 与DDP组相比; & $P<0.05$, 与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比。

A: representative picture of scratch experiment; B: cell mobility; * $P<0.05$ compared with Control group; # $P<0.05$ compared with DDP group; & $P<0.05$ compared with DDP+miR-425-5p inhibitor group.

图1 细胞划痕实验检测细胞迁移情况

Fig.1 Cell migration was detected by cell scratch test

表3 各组细胞侵袭数目的比较

Table 3 Comparison of the number of invasive cells in each group

组别 Group	细胞侵袭数 Number of invasive cells
Control	87.26±6.23
DDP	126.53±8.58*
DDP+miR-425-5p inhibitor	72.04±6.40#
DDP+NC inhibitor	125.98±8.25
DDP+miR-425-5p inhibitor+PIC	188.49±10.66&

* $P<0.05$, 与Control组相比; # $P<0.05$, 与DDP组相比; & $P<0.05$, 与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比。

* $P<0.05$ compared with Control group; # $P<0.05$ compared with DDP group; & $P<0.05$ compared with DDP+miR-425-5p inhibitor group.

*PTEN*表达量显著升高($P<0.05$); DDP+NC inhibitor组细胞miR-425-5p、*PTEN*、*PI3K*和*AKT*表达量无显著性差异($P>0.05$)。与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor+PIC组细胞miR-425-5p、*PI3K*和*AKT*表达量显著增加($P<0.05$); *PTEN*表达量显著下降($P<0.05$)(表5)。

2.7 各组细胞中PTEN/PI3K/AKT信号通路相关蛋白的表达比较

与Control组相比, DDP组细胞PTEN、PI3K和AKT蛋白表达量无显著性差异($P>0.05$)。与DDP组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor组细胞PTEN蛋白表达量显著增加($P<0.05$), PI3K蛋白和AKT蛋白磷酸化水平显著降低($P<0.05$); DDP+NC inhibitor

组细胞PTEN、PI3K和AKT蛋白表达量无显著性差异($P>0.05$)。与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor+PIC组细胞PTEN蛋白表达量显著降低($P<0.05$), PI3K蛋白和AKT蛋白磷酸化水平显著升高($P<0.05$)(表6和图4)。

2.8 miR-425-5p与PTEN的靶向关系

利用TargetScan预测miR-425-5p与*PTEN*的结合位点, 结果如图5A所示。与NC mimic和PTEN-WT共转染组比较, miR-425-5p mimic和PTEN-WT共转染组的荧光素酶活性显著降低($P<0.05$); 与NC mimic和PTEN-MUT共转染组比较, miR-425-5p mimic和PTEN-MUT共转染组的荧光素酶活性无显著性差异($P>0.05$)(图5B和表7)。

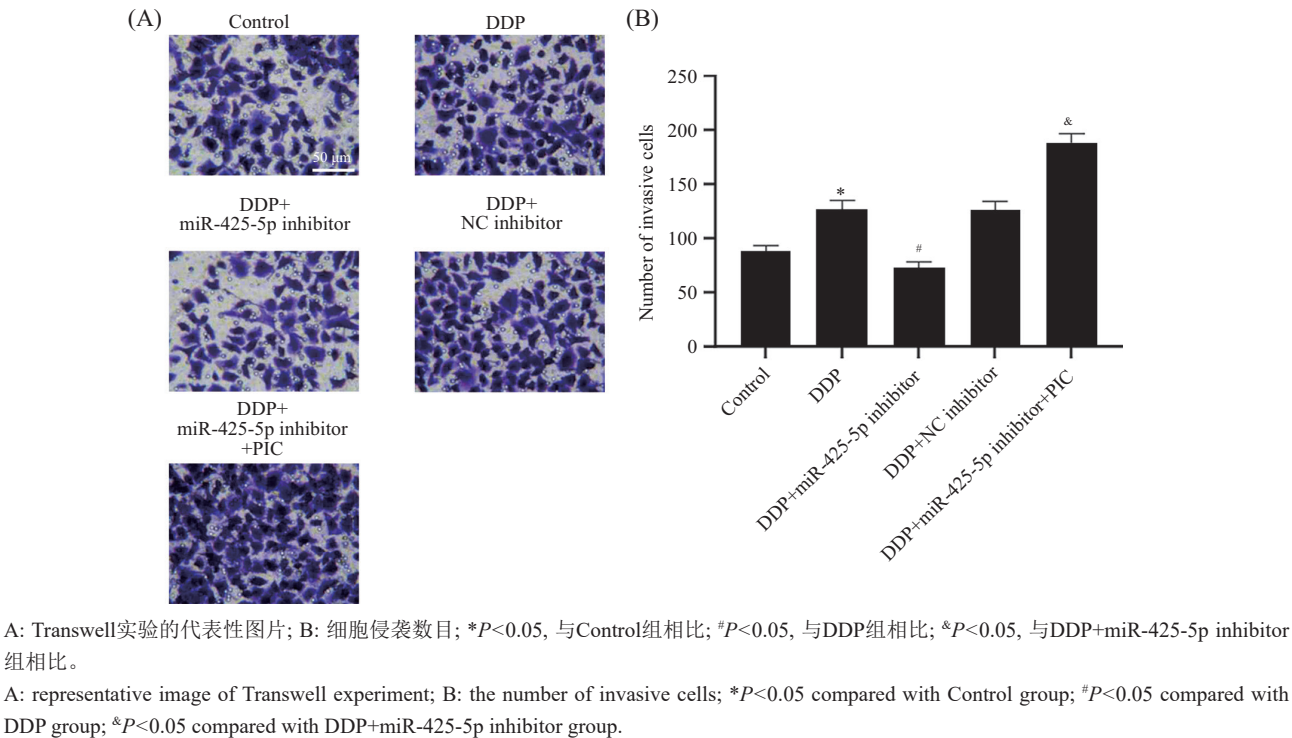


图2 Transwell实验检测细胞侵袭能力(结晶紫染色)
Fig.2 Cell invasion ability was detected by Transwell assay (crystal violet staining)

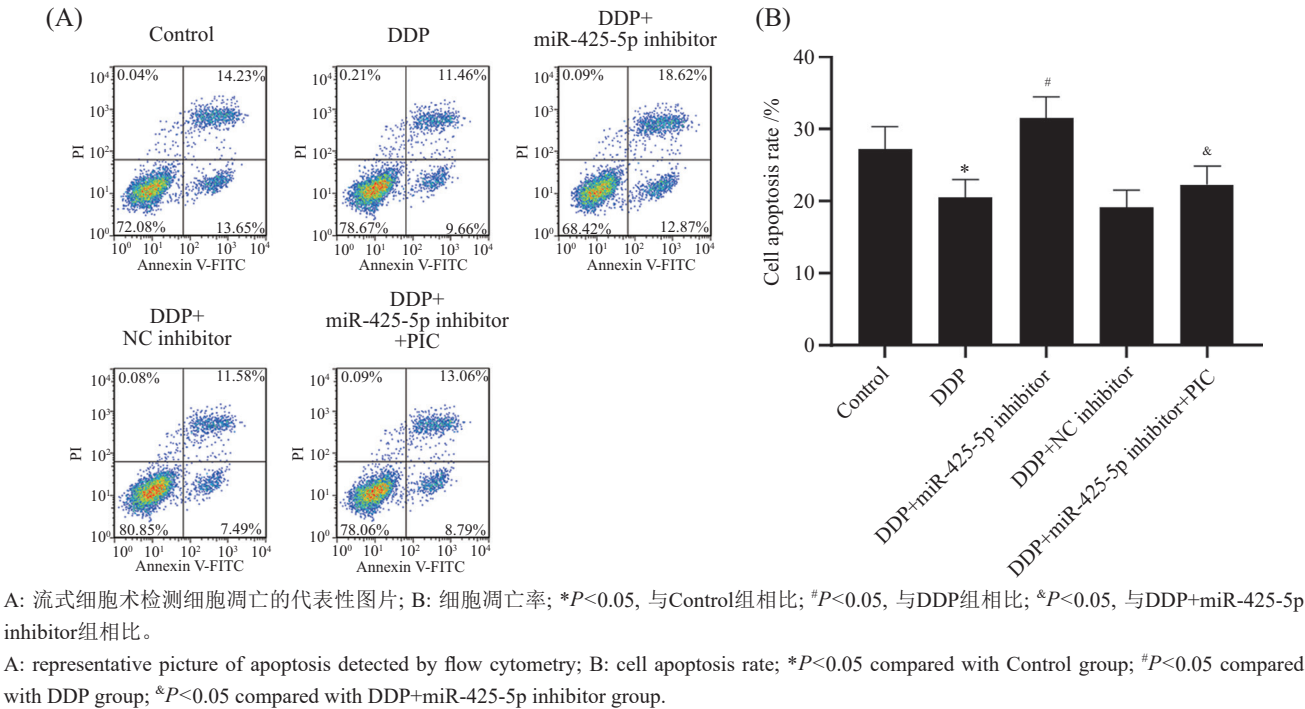


图3 流式细胞术检测细胞凋亡情况
Fig.3 Cell apoptosis was detected by flow cytometry

3 讨论

OC是女性生殖系统常见的恶性肿瘤, 其患者生存率低、死亡率高, 诊断时通常已发展至晚期, 这些

为OC的治疗带来了巨大阻碍与挑战^[12]。临床治疗OC常用化疗, 其中DDP作为治疗OC的一线抗肿瘤药物, 在临床治疗中应用广泛。DDP具有良好的抗

表4 各组细胞凋亡率比较
Table 4 Comparison of cell apoptosis rate in each group

组别 Group	细胞凋亡率/% Cell apoptosis rate /%
Control	27.20±3.14
DDP	20.47±2.55*
DDP+miR-425-5p inhibitor	31.54±2.94 [#]
DDP+NC inhibitor	19.14±2.36
DDP+miR-425-5p inhibitor+PIC	22.34±2.50 ^{&}

* $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与DDP组相比; [&] $P<0.05$, 与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比。

* $P<0.05$ compared with Control group; [#] $P<0.05$ compared with DDP group; [&] $P<0.05$ compared with DDP+miR-425-5p inhibitor group.

表5 各组细胞中miR-425-5p以及PTEN、PI3K和AKT mRNA表达水平比较
Table 5 Comparison of expression of miR-425-5p, as well as PTEN, PI3K and AKT mRNA in each group

组别 Group	miR-425-5p	PTEN	PI3K	AKT
Control	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
DDP	1.25±0.05	1.03±0.04	1.06±0.01	0.98±0.02
DDP+miR-425-5p inhibitor	0.61±0.05 [#]	1.36±0.10 [#]	0.68±0.06 [#]	0.70±0.06 [#]
DDP+NC inhibitor	1.02±0.07	1.06±0.06	1.08±0.08	1.02±0.09
DDP+miR-425-5p inhibitor+PIC	0.88±0.06 ^{&}	1.12±0.08 ^{&}	0.92±0.10 ^{&}	0.96±0.08 ^{&}

[#] $P<0.05$, 与DDP组相比; [&] $P<0.05$, 与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比。

[#] $P<0.05$ compared with DDP group; [&] $P<0.05$ compared with DDP+miR-425-5p inhibitor group.

表6 各组细胞中PTEN/PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达比较
Table 6 Comparison of PTEN/PI3K/AKT signaling pathway related proteins in each group

组别 Group	PTEN	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
Control	0.52±0.06	0.65±0.08	0.74±0.06
DDP	0.55±0.06	0.69±0.07	0.72±0.05
DDP+miR-425-5p inhibitor	0.87±0.09 [#]	0.48±0.05 [#]	0.43±0.06 [#]
DDP+NC inhibitor	0.58±0.05	0.67±0.07	0.71±0.06
DDP+miR-425-5p inhibitor+PIC	0.63±0.07 ^{&}	0.72±0.06 ^{&}	0.69±0.05 ^{&}

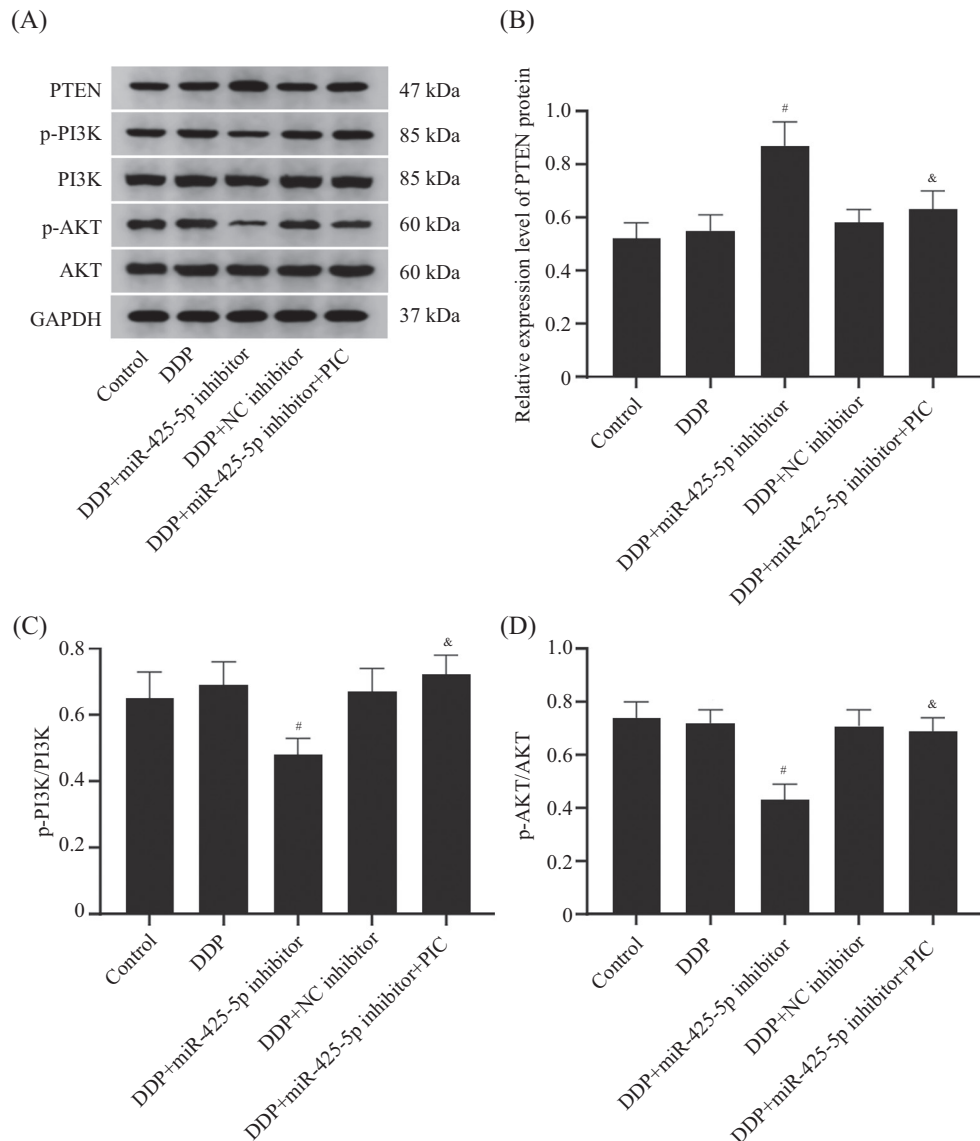
[#] $P<0.05$, 与DDP组相比; [&] $P<0.05$, 与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比。

[#] $P<0.05$ compared with DDP group; [&] $P<0.05$ compared with DDP+miR-425-5p inhibitor group.

肿瘤效果, 但长期使用DDP会引起肿瘤细胞对其产生耐药性, 减弱治疗效果^[13]。DDP主要通过DNA交联形成加合物, 诱导DNA双链断裂发挥抗肿瘤作用。现有研究表明, DDP耐药机制主要有以下几种: (1) 细胞内凋亡蛋白水平下降; (2) 细胞内存在药物解毒机制; (3) 影响DNA损伤与修复等^[14-15]。因此, 增加DDP对OC细胞的敏感性, 降低其耐药性, 将为临床治疗研究带来曙光。本研究分别培养了OC细胞A2780和对DDP耐药的细胞A2780/DDP, 研究结果显示, 与Control组高敏感性的A2780细胞相比, DDP组A2780/DDP细胞的增殖能力(48 h、72 h)、迁移

率、细胞侵袭数目显著升高($P<0.05$), 细胞凋亡率显著降低($P<0.05$)。这些结果说明A2780/DDP细胞对DDP的敏感度降低, 对DDP产生耐药性。

研究表明, miRNA可通过调节下游靶基因表达参与细胞增殖、凋亡、迁移等多种生物学过程^[16]。越来越多证据表明, miRNA在提高药物敏感性方面具有独特作用。孙小虎等^[17]研究发现miR-451a在宫颈癌组织中低表达, 其表达水平与宫颈癌患者化疗耐药呈负相关, 其可能通过调控上皮-间质转化抑制宫颈癌细胞的侵袭和DDP耐药。杨万荷等^[18]研究发现miR-106a-5p能通过抑制ERK2的表达, 降低胃癌细



A: PTEN/PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达条带图; B: PTEN蛋白相对表达水平; C: p-PI3K/PI3K值; D: p-AKT/AKT值; [#] $P<0.05$, 与DDP组相比; [&] $P<0.05$, 与DDP+miR-425-5p inhibitor组相比。

A: PTEN/PI3K/AKT signaling pathway related protein expression strip; B: relative expression level of PTEN protein; C: p-PI3K/PI3K ratio; D: p-AKT/AKT ratio; [#] $P<0.05$ compared with DDP group; [&] $P<0.05$ compared with DDP+miR-425-5p inhibitor group.

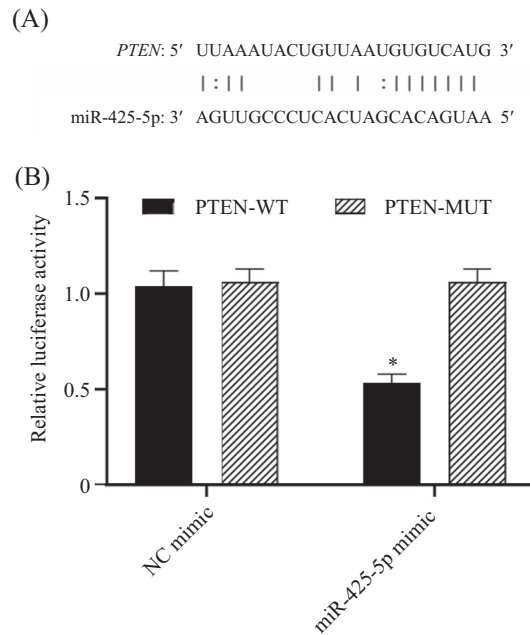
图4 Western blot检测A2780细胞中PTEN/PI3K/AKT信号通路相关蛋白的表达情况

Fig.4 Western blot analysis of PTEN/PI3K/AKT signaling pathway related proteins in A2780 cells

胞对DDP的耐药性, 这些可能与抑制增殖相关蛋白表达、逆转上皮-间质转化、降低耐药基因表达有关。SONG等^[19]研究发现, 外泌体miR-4443能通过调节FSP1 m6A修饰介导的铁死亡, 来增加非小细胞肺癌对DDP的敏感性。这些结果说明miRNA参与肿瘤细胞对DDP的耐药相关过程^[20]。miR-425-5p在多种肿瘤(如前列腺癌^[21]、乳腺癌^[22]、OC^[7])组织或细胞中异常表达。WU等^[7]研究发现miR-425-5p在OC中表达上调, 能通过靶向下调AFF4 mRNA和AFF4蛋白表达来促进OC细胞的增殖、迁移和侵袭, 在OC中发

挥促癌作用。在本研究中, 通过构建DDP耐药A2780细胞(A2780/DDP), 笔者发现A2780/DDP细胞中miR-425-5p表达水平高于A2780细胞, 且与DDP组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor组细胞的增殖能力(48 h、72 h)、迁移率、细胞侵袭数目显著降低($P<0.05$), 细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)。这些结果说明下调miR-425-5p能增加OC细胞对DDP的敏感性。

PTEN位于人类第10号染色体, 是一种抑癌基因。PTEN的异常表达与恶性肿瘤的发生发展等病理生理过程紧密相关, 且其可通过负向调控PI3K/AKT信号



A: miR-425-5p与PTEN的结合位点预测; B: 验证miR-425-5p与PTEN靶向关系的双荧光素酶检测结果; * $P < 0.05$, 与NC mimic和PTEN-WT共转染组比较。

A: prediction of binding sites of miR-425-5p and PTEN; B: dual-luciferase gene reporter assay results to verify the targeting relationship between miR-425-5p and PTEN; * $P < 0.05$ compared with NC mimic and PTEN-WT co-transfection group.

图5 miR-425-5p与PTEN的靶向关系

Fig.5 Targeting relationship between miR-425-5p and PTEN

表7 荧光素酶活性比较

Table 7 Comparison of luciferase activities

组别 Group	荧光素酶活性 Luciferase activity
NC mimic and PTEN-WT co-transfection group	1.24±0.08
NC mimic and PTEN-MUT co-transfection group	1.06±0.07
miR-425-5p mimic and PTEN-WT co-transfection group	0.53±0.05*
miR-425-5p mimic and PTEN-MUT co-transfection group	1.08±0.09

* $P < 0.05$, 与NC mimic和PTEN-WT共转染组比较。

* $P < 0.05$ compared with NC mimic and PTEN-WT co-transfection group.

通路来调节细胞增殖、凋亡等过程^[23]。PI3K/AKT信号通路在细胞增殖、生长、凋亡、代谢等过程中发挥着重要的作用。当PI3K/AKT信号通路被激活后, PI3K催化PIP2转化为PIP3, 导致AKT从细胞质中转移至细胞膜, 通过磷酸肌醇依赖性激酶(phosphoinositol dependent kinase, PDK)促进AKT磷酸化^[24-25]。PTEN能够拮抗PIP3介导的PIP2磷酸化, 使PIP3去磷酸化, 从而负向调控PI3K/AKT信号通路的活化^[26]。NI等^[27]研究发现miR-301a的过表达能下调PTEN表达, 激活PI3K/AKT信号通路, 促进OC细胞增殖, 抑制其凋亡。AMINI-FARSANI等^[28]研究表明, miR-221/222通过靶向PTEN/PI3K/AKT信号通路, 诱导OC细胞的顺铂耐

药。PTEN为miR-425-5p的下游靶基因, 据报道, miR-425-5p可通过靶向下调PTEN mRNA和蛋白表达促进乳腺癌细胞增殖和迁移。本研究结果显示, 与DDP组相比, DDP+miR-425-5p inhibitor组细胞miR-425-5p表达水平、PI3K和AKT mRNA表达水平和蛋白磷酸化水平显著降低($P < 0.05$), PTEN mRNA和蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。因此推测下调miR-425-5p可能上调PTEN, 进而抑制PI3K/AKT信号通路, 提高A2780细胞对DDP的敏感性。为了验证此猜想, 本研究利用了生物信息学软件、双荧光素酶报告基因实验对miR-425-5p和PTEN的靶向关系进行了预测和验证, 结果显示PTEN是miR-425-5p的靶基因之一, 且具有负

向调控作用。此外,我们用PTEN的抑制剂PIC干预DDP+miR-425-5p inhibitor组细胞,结果显示,PIC减弱了该组细胞对DDP的敏感性。

综上所述,下调miR-425-5p可能通过调控PTEN/PI3K/AKT轴,增加OC细胞对DDP的敏感性。这说明miR-425-5p可能成为改善OC耐药性的一个新靶点。然而本研究还存在不足之处,未收集临床样本深入验证miR-425-5p在OC中的表达情况及功能,在未来的研究中会对其进行补充;此外,miR-425-5p在体内的作用与机制还需进一步设计实验(体内裸鼠移植瘤实验)进行研究。

参考文献 (References)

- [1] PENNY S M. Ovarian cancer: an overview [J]. Radiol Technol, 2020, 91(6): 561-75.
- [2] 李可, 汪璟, 胥婧, 等. 慢性应激对卵巢癌的影响及其机制研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志(LI K, WANG J, XU J, et al. Research progress on the effect of chronic stress on ovarian cancer and its mechanism [J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics), 2019, 35(2): 243-6.
- [3] WANG Y, XIE D, PAN J, et al. A near infrared light-triggered human serum albumin drug delivery system with coordination bonding of indocyanine green and cisplatin for targeting photochemistry therapy against oral squamous cell cancer [J]. Biomater Sci, 2019, 7(12): 5270-82.
- [4] GIAMPAOLINO P, DELLA CORTE L, FORESTE V, et al. Unraveling a difficult diagnosis: the tricks for early recognition of ovarian cancer [J]. Minerva Med, 2019, 110(4): 279-91.
- [5] NI J, ZHANG X, LI J, et al. Tumour-derived exosomal lncRNA-SOX2OT promotes bone metastasis of non-small cell lung cancer by targeting the miRNA-194-5p/RAC1 signalling axis in osteoclasts [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(7): 662.
- [6] 徐丽秀, 美力班·吐尔逊, 克热曼·牙库甫. miR-181a在卵巢癌细胞中对顺铂的耐药作用[J]. 昆明医科大学学报(XU L X, MELIBAN TURSUN, KEJEMANN YAKUPU. Resistance of miR-181a to cisplatin in ovarian cancer cells [J]. Journal of Kunming Medical University), 2022, 43(1): 20-5.
- [7] WU Z, GUO J, ZHANG Y, et al. MiR-425-5p accelerated the proliferation, migration, and invasion of ovarian cancer cells via targeting AFF4 [J]. J Ovarian Res, 2021, 14(1): 138.
- [8] XING X, GUO S, ZHANG G, et al. miR-26a-5p protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. Braz J Med Biol Res, 2020, 53(2): e9106.
- [9] DENG X, WU H, XIONG L, et al. MiR-92a regulates PTEN/Akt signaling axis to promote paclitaxel resistance in ovarian cancer cells [J]. Acta Biochim Pol, 2023, 70(1): 169-74.
- [10] 刘小莺, 吴莉, 陈洲, 等. PTEN抑制剂对高糖诱导的内皮细胞衰老的影响[J]. 中国药理学通报 (LIU X Y, WU L, CHEN Z, et al. Effect of PTEN inhibitors on endothelial cell senescence induced by high glucose [J]. Chinese Journal of Pharmacology), 2016, 32(4): 514-9.
- [11] 穆卫红, 陈文琪, 彭园园, 等. miR-141-3p表达与卵巢癌细胞顺铂化疗敏感性的相关性研究[J]. 河北医科大学学报(MU W H, CHEN W Q, PENG Y Y, et al. Correlation between miR-141-3p expression and cisplatin chemotherapy sensitivity of ovarian cancer cells [J]. Journal of Hebei Medical University), 2020, 41(2): 167-71.
- [12] QI X, YU C, WANG Y, et al. Network vulnerability-based and knowledge-guided identification of microRNA biomarkers indicating platinum resistance in high-grade serous ovarian cancer [J]. Clin Transl Med, 2019, 8(1): 28.
- [13] MORAND S, DEVANABOYINA M, STAATS H, et al. Ovarian cancer immunotherapy and personalized medicine [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6532.
- [14] ROCHA C R R, SILVA M M, QUINET A, et al. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship [J]. Clinics, 2018, 73(suppl 1): e478s.
- [15] MAKOVEC T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy [J]. Radiol Oncol, 2019, 53(2): 148-58.
- [16] RUPAIMOOLE R, SLACK F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3): 203-22.
- [17] 孙小虎, 赵霞. miR-451a表达抑制宫颈癌细胞侵袭和顺铂耐药的影响及作用机制[J]. 标记免疫分析与临床(SUN X H, ZHAO X. Effect and mechanism of miR-451a expression on cervical cancer cell invasion and cisplatin resistance [J]. Marker Immunassay and Clinic), 2022, 29(4): 637-42.
- [18] 杨万荷, 李家群, 张东艳, 等. miR-106a-5p靶向调控ERK2对胃癌细胞顺铂耐药性的影响及其分子机制[J]. 山东医药(YANG W H, LI J Q, ZHANG D Y, et al. Effects of miR-106a-5p targeting on cisplatin resistance in gastric cancer cells and its molecular mechanism [J]. Shandong Medicine), 2021, 61(17): 14-9.
- [19] SONG Z, JIA G, MA P, et al. Exosomal miR-4443 promotes cisplatin resistance in non-small cell lung carcinoma by regulating FSP1 m6A modification-mediated ferroptosis [J]. Life Sci, 2021, 276: 119399.
- [20] YUWEN D L, SHENG B B, LIU J, et al. MiR-146a-5p level in serum exosomes predicts therapeutic effect of cisplatin in non-small cell lung cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(11): 2650-8.
- [21] RODE M P, SILVA A H, CISILOTTO J, et al. miR-425-5p as an exosomal biomarker for metastatic prostate cancer [J]. Cell Signal, 2021, 87: 110113.
- [22] XIAO S, ZHU H, LUO J, et al. miR-425-5p is associated with poor prognosis in patients with breast cancer and promotes cancer cell progression by targeting PTEN [J]. Oncol Rep, 2019, 42(6): 2550-60.
- [23] 王莹莹, 李文倩, 解友邦, 等. PTEN在自身免疫性疾病中的研究进展[J]. 国际免疫学杂志(WANG Y Y, LI W Q, XIE Y B, et al. Research progress of PTEN in autoimmune diseases [J]. International Journal of Immunology), 2020, 43(5): 559-63.
- [24] YAN R, LI K, YUAN D W, et al. Downregulation of microRNA-4295 enhances cisplatin-induced gastric cancer cell apoptosis through the EGFR/PI3K/Akt signaling pathway by targeting LRIG1 [J]. Int J Oncol, 2018, 53(6): 2566-78.
- [25] ZHANG Y, FANG J, ZHAO H, et al. Downregulation of microR-

- NA-1469 promotes the development of breast cancer via targeting HOXA1 and activating PTEN/PI3K/AKT and Wnt/ β -catenin pathways [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 5097-107.
- [26] JIANG Y, CHANG H, CHEN G. Effects of microRNA-20a on the proliferation, migration and apoptosis of multiple myeloma via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 10001-7.
- [27] NI J, CHEN Y, FEI B, et al. MicroRNA-301a promotes cell proliferation and resistance to apoptosis through PTEN/PI3K/Akt signaling pathway in human ovarian cancer [J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2021, 86(1/2): 108-16.
- [28] AMINI-FARSANI Z, SANGTARASH M H, SHAMSARA M, et al. MiR-221/222 promote chemoresistance to cisplatin in ovarian cancer cells by targeting PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Cytotechnology*, 2018, 70(1): 203-13.