

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.005

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.005

## MiRNA-92a 靶向 PTEN 通过 PI3K/AKT 信号通路 促进卵巢癌细胞转移

王秋宇<sup>1</sup>, 朱军义<sup>1</sup>, 邓巧子<sup>2</sup>

(1. 南阳市中心医院妇产科, 河南 南阳 473000; 2. 河南科技大学第一附属医院新区医院妇产科, 河南 洛阳 471000)

**[摘要]** 目的: 探讨miRNA-92a对卵巢癌细胞侵袭与迁移能力变化的影响和可能的作用机制。方法: RT-qPCR检测卵巢癌组织和卵巢癌细胞miRNA-92a的表达水平; 转染miRNA-92a inhibitor/mimic后, Transwell小室法检测SKOV3与A2780细胞的侵袭与迁移能力; 蛋白质印迹法检测SKOV3与A2780细胞中p-PI3k, p-Akt和PTEN蛋白水平的变化; 预测miRNA-92a靶基因并经双荧光素酶报告基因验证。结果: MiRNA-92a在卵巢癌组织和卵巢癌细胞中高表达( $P<0.05$ ); 转染miRNA-92a inhibitor后, SKOV3与A2780细胞的侵袭和迁移能力明显受到抑制, 同时p-PI3k和p-Akt蛋白水平均显著降低, PTEN蛋白水平显著升高(均 $P<0.05$ ); 转染miRNA-92a mimic后, 以上指标相反; miRNA-92a靶基因为PTEN, 且过表达PTEN能逆转过表达miRNA-92a诱导的侵袭转移与p-PI3k, p-Akt表达(均 $P<0.05$ )。结论: MiRNA-92a直接结合靶基因PTEN, 通过激活PI3k/Akt通路活性, 促进卵巢癌细胞SKOV3的侵袭与迁移能力。

**[关键词]** 卵巢癌; miRNA-92a; 侵袭; 迁移

## MiRNA-92a promote metastasis in ovarian cancer cells through PI3K/Akt signaling pathway by targeting PTEN

WANG Qiuyu<sup>1</sup>, ZHU Junyi<sup>1</sup>, DENG Qiaozi<sup>2</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Nanyang City Center Hospital, Nanyang Henan 473000; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang Henan 471000, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the effects and the possible mechanisms of miRNA-92a on the abilities of cell invasion and migration in ovarian cancer cells. **Methods:** The expressions of miRNA-92a in the ovarian cancer tissues and ovarian cancer cells were detected by RT-qPCR. After transfection with miRNA-92a inhibitor or mimic, the abilities of SKOV3 and A2780 cell invasion and migration were determined by Transwell assay. The protein levels of p-PI3K, p-Akt and PTEN were measured by Western blotting. Further, miRNA-92a target gene was predicted and then be verified by dual-luciferase reporter system assay. **Results:** The expressions of miRNA-92a were

收稿日期 (Date of reception): 2019-07-19

通信作者 (Corresponding author): 邓巧子, Email: dengqiaozi2114@aliyun.com

基金项目 (Foundation item): 洛阳市应用技术与开发基金项目 (1201052A2)。This work was supported by Luoyang Applied Technology Research and Development Project Foundation, China (1201052A2).

significantly higher in the ovarian cancer tissue and ovarian cancer cells ( $P < 0.05$ ). After transfected with miRNA-92a inhibitor into SKOV3 and A2780 cells, the abilities of invasion and migration were dramatically reduced, the protein levels of p-PI3K and p-Akt were markedly decreased and PTEN was markedly increased (all  $P < 0.05$ ). However, after transfection with miRNA-92a mimic, the above indicators were contrary. Furthermore, PTEN was the direct target gene of miRNA-92a, and over-expression PTEN reversed the migration and invasion induced by over-expression miRNA-92a in SKOV3 and A2780 cells, and the high expression of p-PI3k and p-Akt (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** MiRNA-92a promotes the abilities of invasion and migration in the SKOV3 and A2780 ovarian cancer cells through activating of PI3K/Akt pathway by direct targeting PTEN.

**Keywords** ovarian cancer; miRNA-92a; invasion; migration

卵巢癌是妇科恶性肿瘤中病死率最高的一种, 其发病率在女性恶性肿瘤中排第3位<sup>[1]</sup>。近年来卵巢癌在临床上主要采用手术与化疗放疗方案, 但大多数患者在就诊时已出现肿瘤已侵破包膜和血管, 出现盆腹腔或更远端的转移, 导致患者长期生存率降低<sup>[2-3]</sup>。由此可见, 恶性肿瘤的侵袭、转移是严重威胁患者生存期的重要因素。基于此, 研究卵巢癌细胞的侵袭、转移机制尤为重要。

微小RNA(microRNA, miRNA)通过与靶mRNA的3'端非编码序列结合来影响蛋白质的合成<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>表明: miRNAs参与肿瘤细胞的病理进程, 尤其是上皮间质转化与迁移。在组织与体外细胞培养定量miRNA, 通过体外改变miRNA的表达量研究miRNA对肿瘤细胞的侵袭、迁移等能力的作用<sup>[6]</sup>。Resnick等<sup>[7]</sup>研究发现miRNA-92a在早期卵巢癌患者的血清中异常升高。另外有研究<sup>[8]</sup>发现: miRNA-92a在腹水中的表达水平与在卵巢癌组织表达水平一致, 且与卵巢癌进程相关。以上结果提示: miRNA-92a与卵巢癌的进程密切相关, 但前人的文献中关于miRNA-92a在卵巢癌侵袭和迁移的具体作用机制尚未完全清楚。因此, 本研究通过检测不同迁移程度的卵巢癌中miRNA-92a的表达, 研究miRNA-92a对卵巢癌细胞侵袭与迁移能力的影响, 并探讨其作用机制。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

#### 1.1.1 实验样本

收集来自南阳市中心医院妇产科2012年6月至2015年6月期间接受手术的卵巢恶性肿瘤患者共90例, 其中卵巢癌组织32例(原发性卵巢癌组织8例, 转移性卵巢癌组织24例), 卵巢良性肿瘤组

织28例, 正常卵巢组织30例。所有组织标本均经过专业病理科人员确认。本实验通过南阳市中心医院医学伦理委员会批准(编号: 2015081203), 且纳入研究的患者均签署知情同意书。

#### 1.1.2 细胞与试剂

卵巢癌细胞株SKOV3, A2780, OVCA433购自中国科学院上海细胞库, 人正常卵巢上皮细胞株IOSE80购自上海慧颖生物科技有限公司; RPMI-1640培养液与新生牛血清购自美国Gibco公司; miRNA-92a引物、PTEN引物、反转录试剂盒、PCR检测试剂盒、lipofectamine<sup>TM</sup>2000、PTEN-siRNA和阴性对照siRNA(negative control siRNA, NC-siRNA)购自美国Invitrogen公司; 抗p-PI3k/PI3K, p-Akt/Akt, PTEN与 $\beta$ -actin抗体购自美国Santa Cruz公司; miRNA-92a inhibitor(miR-92a i)和配对inhibitor阴性对照miRNA (negative control miRNA inhibitor, NC-i)、miRNA-92a mimics(miR-92a m)和配对mimics阴性对照miRNA (negative control miRNA mimics, NC-m)由广州锐博生物科技有限公司合成; 慢病毒PTEN载体pLV-PTEN-RFP和慢病毒对照载体pLV-RFP由上海吉玛制药技术有限公司合成; 双荧光素酶检测试剂盒购自美国Promega公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养、传代

将SKOV3, A2780, OVCA433细胞加入含有10%新生牛血清, 青霉素与链霉素各100 U/mL的RPMI-1640培养液, 置于37 °C, 5% CO<sub>2</sub>的饱和湿度恒温培养箱中培养, 2~3 d更换培养基1次。实验取对数生长期细胞。待细胞生长率达到90%行细胞传代, 吸去原有培养液, 加入1 mL 0.25%胰蛋白酶消化, 吹打至细胞悬液, 计数后分到相应培养皿中, 继续培养, 观察贴壁情况。

### 1.2.2 细胞转染

收集SKOV3与A2780细胞,按照说明书方法,对细胞进行转染miR-92a i, NC-i, miR-92a m, NC-m, NC-siRNA, PTEN-siRNA, pLV-RFP和pLV-PTEN-RFP。收集稳定对数生长期的SKOV3与A2780细胞,0.25%胰酶消化后置于6孔板中,待细胞密度到达约80%融合时,更换新鲜无血清培养基继续培养同步化12 h后,按说明书进行转染,6 h后吸去转染液,每孔加入含10% FBS的RPMI-1640培养基继续孵育,48 h后收集细胞。该转染细胞用于后续Transwell细胞迁移实验、Transwell细胞侵袭实验、蛋白质印迹法检测和RT-qPCR检测。

### 1.2.3 Transwell 细胞侵袭和细胞迁移实验

将SKOV3与A2780细胞分别加入含有0.1% FBS的RPMI-1640培养基中孵育18 h,用4℃预冷的无血清培养基稀释Matrigel,使终浓度为1 mg/mL,往小室底部中央垂直加入100 μL稀释后的Matrigel,37℃温育使聚合成胶。将 $1 \times 10^5$ 个已消化的细胞加入无血清RPMI-1640培养基使终体积为100 μL,混匀,加入Transwell小室的上室,下室中加入含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液,避免产生气泡。在5% CO<sub>2</sub>,37℃恒温培养箱中培养24 h,PBS洗2次,10%甲醛固定15 min,0.1%结晶紫染色30 min,于倒置显微镜下计数。Transwell细胞迁移实验的步骤与Transwell细胞侵袭实验一致,只是不铺Matrigel。

### 1.2.4 双荧光素酶报告基因检测

使用miRanda预测miRNA-92a的靶基因,然后结合基因功能挑选靶基因PTEN并进行验证。构建野生型(WT-3'-UTR)及突变型(Mutant-3'-UTR)PTEN 3'-UTR-荧光素酶表达载体,并将其和/或miR-92a mimics/inhibitor转入293T细胞中,培养48 h后,加入100 μL的PLB裂解细胞。取细胞裂解液加入发光板后再加入100 μL LAR II工作液混匀,用GloMax生物发光检测仪读取荧光值;随后,每样品再加入100 μL Stop & Glo® Reagent,快速混匀后,GloMax生物发光检测仪读取荧光值。然后依据双荧光素酶检测试剂盒说明书,使用荧光素酶报告基因检测仪进行测定。实验结果以荧光素酶的活性与Renilla的活性的比值来进行统计学分析。

### 1.2.5 RT-qPCR

将样本组织或细胞加入1 mL裂解液,-4℃离心5 min,严格按照TRIzol说明书要求,提取各组组织或细胞的总RNA,定量后反转录合成cDNA,取

cDNA和引物,按照PCR试剂盒说明书方法检测基因表达。

MiRNA-92a的正向引物为5'-GCTGAGTAT-TGCACTGTCCCG-3',反向引物为5'-GTGTCTG-GAGTTCGGCAA-3';PTEN的正向引物为5'-CCGA-AAGGTTTTGCTACCATTCT-3',反向引物为5'-AAAATTATTTCTTTCTAGCATTCC-3';β-actin的正向引物为5'-CCTGTACGCCAACACA-GTGC-3',反向引物为5'-ATACTCCTGCTTGCT-GATC-3';U6的正向引物为5'-CTCGCTTCG-GCAGCACA-3',反向引物为5'-AACGCTTCAC-GAATTTGCGT-3'。扩增条件为95℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 50 s,共35个循环,72℃延伸7 min。miRNA-92a以U6做为内参,PTEN以β-actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因相对表达量。

### 1.2.6 蛋白质印迹法检测相关蛋白

收集各组细胞,按试剂盒说明书提取总蛋白,测定蛋白浓度,每道加入50 μg蛋白进行SDS-PAGE电泳,湿转将蛋白转至PVDF膜,加入5%脱脂牛奶的PBS缓冲液封闭1 h,加入一抗(PI3k与Akt 1:4 000,p-PI3k与p-Akt 1:2 000,PTEN与β-actin 1:4 000),4℃过夜,洗膜后加入相应二抗(1:5 000),室温孵育1 h,洗膜,化学发光法显色,冲洗显色凝胶成像系统扫描分析蛋白条带。

## 1.3 统计学处理

采用SPSS 15.0软件进行数据分析,数据以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组比较采用单因素方差分析,两两比较采用Benferroni校正的t检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RT-qPCR 检测各卵巢组织样本中 miRNA-92a 表达水平

RT-qPCR结果显示:正常卵巢组织( $n=30$ )中miRNA-92a的表达水平很低,而卵巢癌患者的卵巢组织( $n=32$ )中miRNA-92a呈高表达,显著高于正常卵巢组织( $P < 0.05$ );良性肿瘤卵巢组织( $n=28$ )中的miRNA-92a水平略高于正常组织,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图1A)。进一步统计发现:转移性卵巢癌组织( $n=24$ )中的miRNA-92a表达最高( $P < 0.05$ ,图1B)。

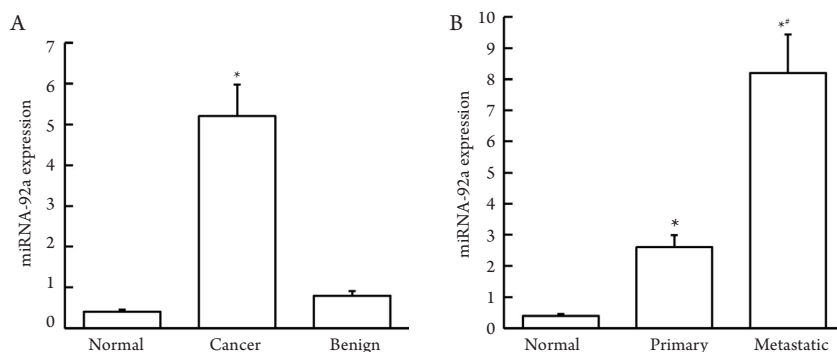


图1 不同卵巢组织中miRNA-92a的表达

Figure 1 Expression of miRNA-92a in different ovarian tissues

(A)不同卵巢组织; (B)不同程度的转移性卵巢癌组织。\* $P < 0.05$  vs正常卵巢组织; \*\* $P < 0.05$  vs原发性卵巢癌组织。

(A) Different ovarian tissues; (B) Different degrees of metastatic ovarian cancer tissues. \* $P < 0.05$  vs normal ovarian tissue; \*\* $P < 0.05$  vs primary ovarian cancer tissue.

## 2.2 RT-qPCR 检测卵巢癌细胞中 miRNA-92a 表达水平

RT-qPCR结果显示: 正常卵巢上皮细胞IOSE80中miRNA-92a的表达水平很低, 而卵巢癌细胞中miRNA-92a呈高表达( $P < 0.05$ ), 且SKOV3细胞株中miRNA-92a表达相对最高( $P < 0.05$ , 图2A)。进一步研究发现SKOV3和A2780细胞转染miR-92a i, NC-i, miR-92a m和NC-m后, miR-92a i抑制SKOV3与A2780细胞中miRNA-92a表达, miR-92a m促进

SKOV3与A2780细胞中miRNA-92a表达(图2B, 2C)。

## 2.3 miRNA-92a 对 SKOV3 与 A2780 细胞迁移和侵袭能力的影响

与对照组相比, miR-92a i转染组的SKOV3细胞的细胞迁移数与侵袭数均显著减少( $P < 0.05$ ), 而miR-92a m转染组的SKOV3细胞的细胞迁移数与侵袭数均显著增加( $P < 0.05$ , 图3A)。A2780细胞株的结果与SKOV3结果相似(图3B)。

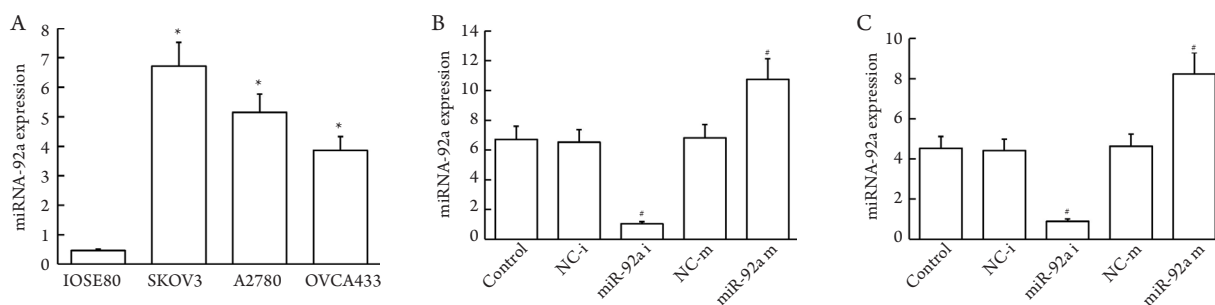


图2 miRNA-92a在各细胞株中的表达

Figure 2 Expression of miRNA-92a in different cells

(A)几种卵巢癌细胞株(SKOV3, A2780和OVCA433)和人正常卵巢上皮细胞(IOSE80) miRNA-92a的表达水平; (B, C)用miRNA-92a mimics或inhibitor转染SKOV3 (B)和A2780 (C)细胞48 h后, RT-qPCR检测miRNA-92a水平。n=6。\* $P < 0.05$  vs IOSE80细胞; \* $P < 0.05$  vs对照组。

(A) miRNA-92a levels in several ovarian cancer cell lines (SKOV3, A2780 and OVCA433) and human normal ovarian epithelium cell line (IOSE80); (B,C) After SKOV3 (B) and A2780 (C) cells transfected with miRNA-92a mimics or inhibitor for 48 h, the levels of miRNA-92a were determined by RT-qPCR. n=6. \* $P < 0.05$  vs IOSE80 cells; \* $P < 0.05$  vs control group.

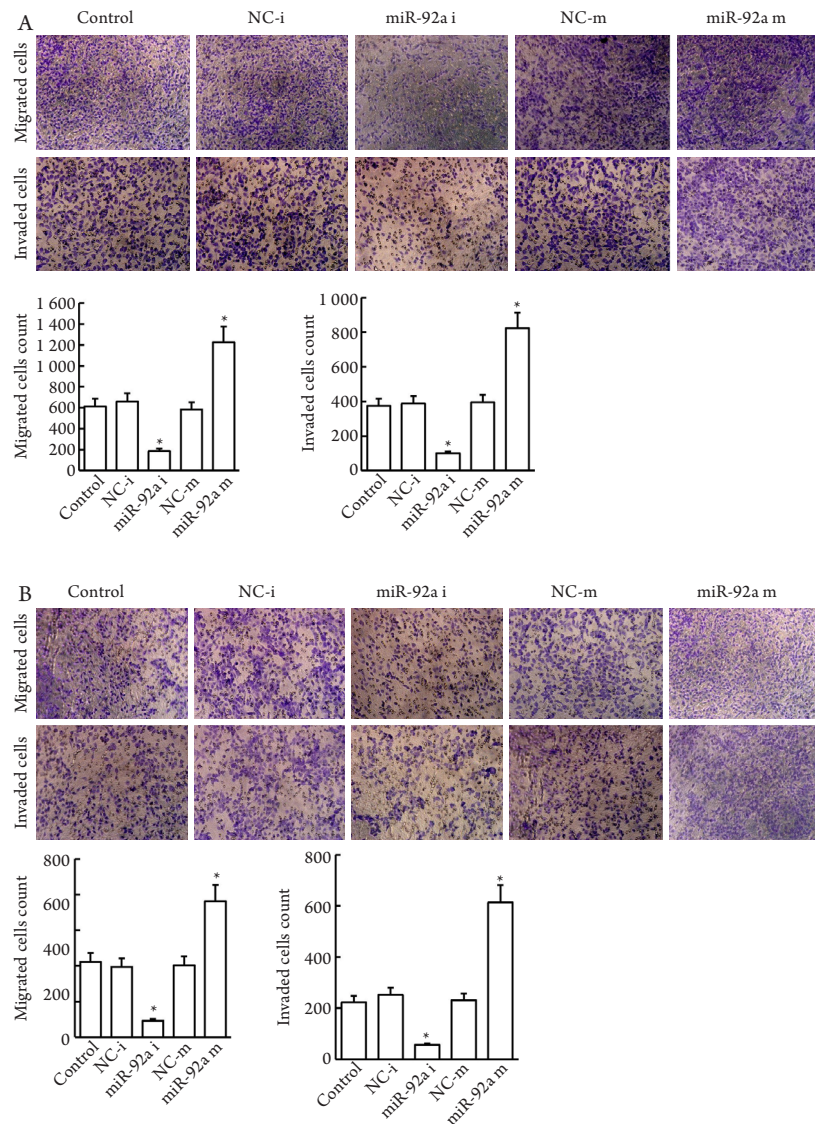


图3 miRNA-92a对SKOV3和A2780细胞迁移侵袭能力的影响( $\times 200$ )

Figure 3 Effect of miRNA-92a on cell migration and invasion in SKOV3 and A2780 cells ( $\times 200$ )

(A)用miRNA-92a mimics或inhibitor转染SKOV3细胞48 h后, Transwell法测定细胞迁移和侵袭; (B)用miRNA-92a mimics或inhibitor转染A2780细胞48 h后, Transwell法测定细胞迁移和侵袭。n=3。\* $P < 0.05$  vs对照组。

(A) After SKOV3 cells transfected with miRNA-92a mimics or inhibitor for 48 h, cell migration and cell invasion were determined by Transwell assay; (B) After A2780 cells transfected with miRNA-92a mimics or inhibitor for 48 h, cell migration and cell invasion were determined by Transwell assay. n=3. \* $P < 0.05$  vs control group.

#### 2.4 miRNA-92a 对 p-PI3k, p-Akt, PTEN 蛋白水平的影响

与control组相比, miR-92a i组的SKOV3(图4A)与A2780(图4B)细胞中p-PI3k, p-Akt蛋白水平显著降低( $P < 0.05$ ), PTEN蛋白水平显著升高( $P < 0.05$ ); miR-92a m转染组的SKOV3(图4A)与A2780(图4B)细胞中p-PI3k, p-Akt蛋白水平显著升高, PTEN蛋白水平均显著降低

( $P < 0.05$ )。

#### 2.5 PTEN 是 miRNA-92a 的直接作用靶基因

miRanda靶基因预测数据库预测miRNA-92a的靶基因为PTEN(图5A); 同时, PTEN mRNA在卵巢癌组织(图5B)和卵巢癌细胞(图5C)中低表达( $P < 0.05$ ); 双荧光素酶报告基因显示: PTEN是miRNA-92a的直接靶基因(图5D)。

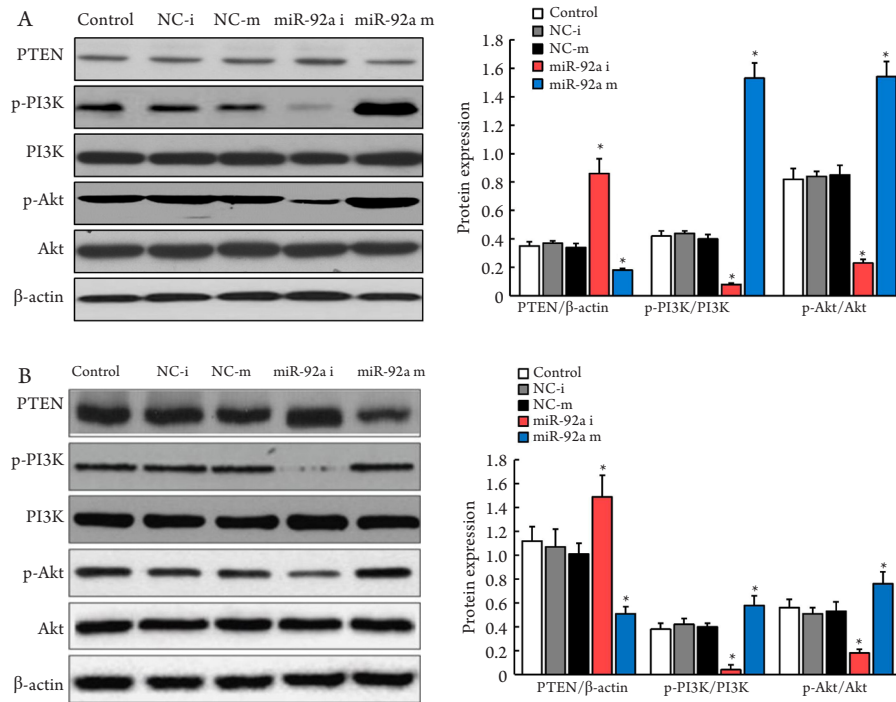


图4 转染miRNA-92a mimics或inhibitor后, SKOV3(A)和A2780(B)细胞的p-PI3k, p-Akt, VEGF和p53蛋白水平  
 Figure 4 Protein levels of p-PI3k, p-Akt, and PTEN in SKOV3 cells (A) and A2780 cells (B) after transfected with miRNA-92a mimics or inhibitor

n=3. \*P<0.05 vs对照组。  
 n=3. \*P<0.05 vs control group.

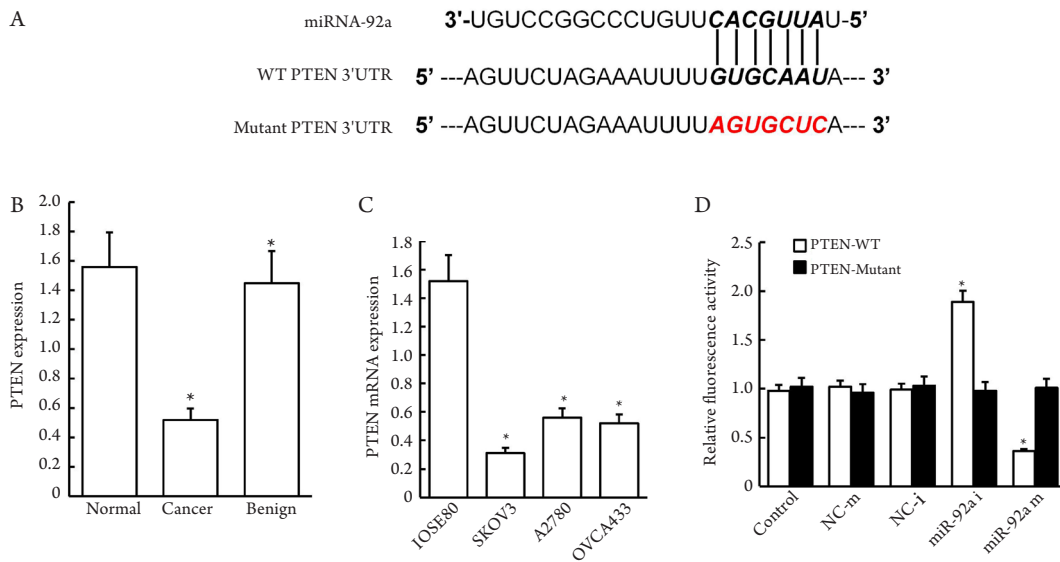


图5 PTEN是miRNA-92a的直接作用靶基因  
 Figure 5 PTEN is the direct target gene of miRNA-92a

(A)PTEN的3'-UTR区域具有预测的miRNA-92a结合位点; (B)在不同卵巢组织中PTEN mRNA表达; (C)在不同细胞中PTEN mRNA表达; (D)通过双荧光素酶报告系统验证PTEN是miRNA-92a的直接靶基因。n=3. \*P<0.05 vs对照组。  
 (A) 3'-UTR of PTEN had a putative binding site of miRNA-92a; (B) mRNA expression of PTEN in different ovarian tissues; (C) mRNA expression of PTEN in different cells; (D) PTEN was the direct target gene of miRNA-92a by dual-luciferase reporter system assay. n=3. \*P<0.05 vs control group.

## 2.6 敲减 PTEN 对 SKOV3 与 A2780 细胞迁移、侵袭能力以及 p-PI3k 和 p-Akt 表达的影响

蛋白质印迹法结果显示：敲减PTEN能促进SKOV3和A2780细胞的p-PI3k和p-Akt表达(均

$P < 0.05$ )。通过Transwell实验发现，敲减PTEN能促进SKOV3和A2780细胞的迁移与侵袭能力(均  $P < 0.05$ , 图6)。

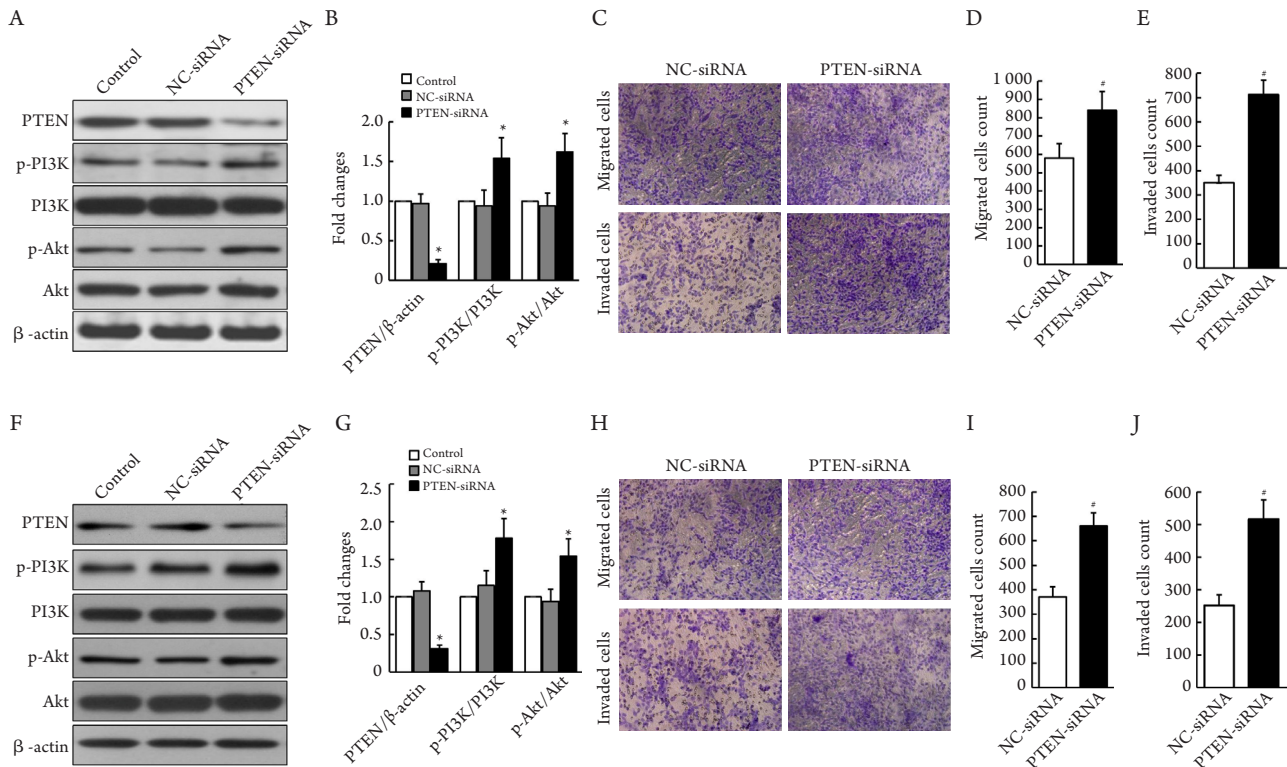


图6 敲减PTEN对SKOV3与A2780细胞迁移、侵袭能力以及p-PI3K和p-Akt表达的影响

**Figure 6 Effect of PTEN knockdown on the protein expressions of p-PI3K and p-Akt, cell migration and cell invasion in SKOV3 and A2780 cells**

(A, B) 转染PTEN-siRNA后, SKOV3细胞中p-PI3k, p-Akt和PTEN蛋白水平的变化; (C~E) 敲减PTEN对SKOV3细胞迁移与侵袭的影响( $\times 200$ ); (F, G) 转染PTEN-siRNA后, A2780细胞中p-PI3K, p-Akt和PTEN蛋白水平的变化; (H~J) 敲减PTEN对A2780细胞迁移与侵袭的影响( $\times 200$ )。  $n=3$ 。\* $P < 0.05$  vs 对照组; # $P < 0.05$  vs NC-siRNA转染组。

(A, B) The protein levels of p-PI3k, p-Akt and PTEN in SKOV3 cells after transfected with PTEN-siRNA; (C~E) Effect of PTEN knockdown on cell migration and invasion in SKOV3 cells ( $200 \times$ ); (F, G) Protein levels of p-PI3K, p-Akt and PTEN in A2780 cells after transfected with PTEN-siRNA; (H~J) Effect of PTEN knockdown on cell migration and invasion in A2780 cells ( $\times 200$ )。  $n=3$ 。\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs NC-siRNA group.

## 2.7 过表达 PTEN 能逆转 miRNA-92a 过表达诱导的侵袭、转移与 p-PI3k, p-Akt 表达

为进一步验证miRNA-92a通过靶向结合PTEN调控卵巢癌细胞侵袭迁移, 在SKOV3和A2780细胞转染miRNA-92a mimics后, 转染慢病毒PTEN载

体pLV-PTEN-RFP, 观察过表达PTEN是否能逆转miRNA-92a mimics的作用。结果显示: 转染慢病毒PTEN载体pLV-PTEN-RFP能逆转过表达miRNA-92a SKOV3和A2780细胞的迁移和侵袭能力及p-PI3k, p-Akt表达(图7)。

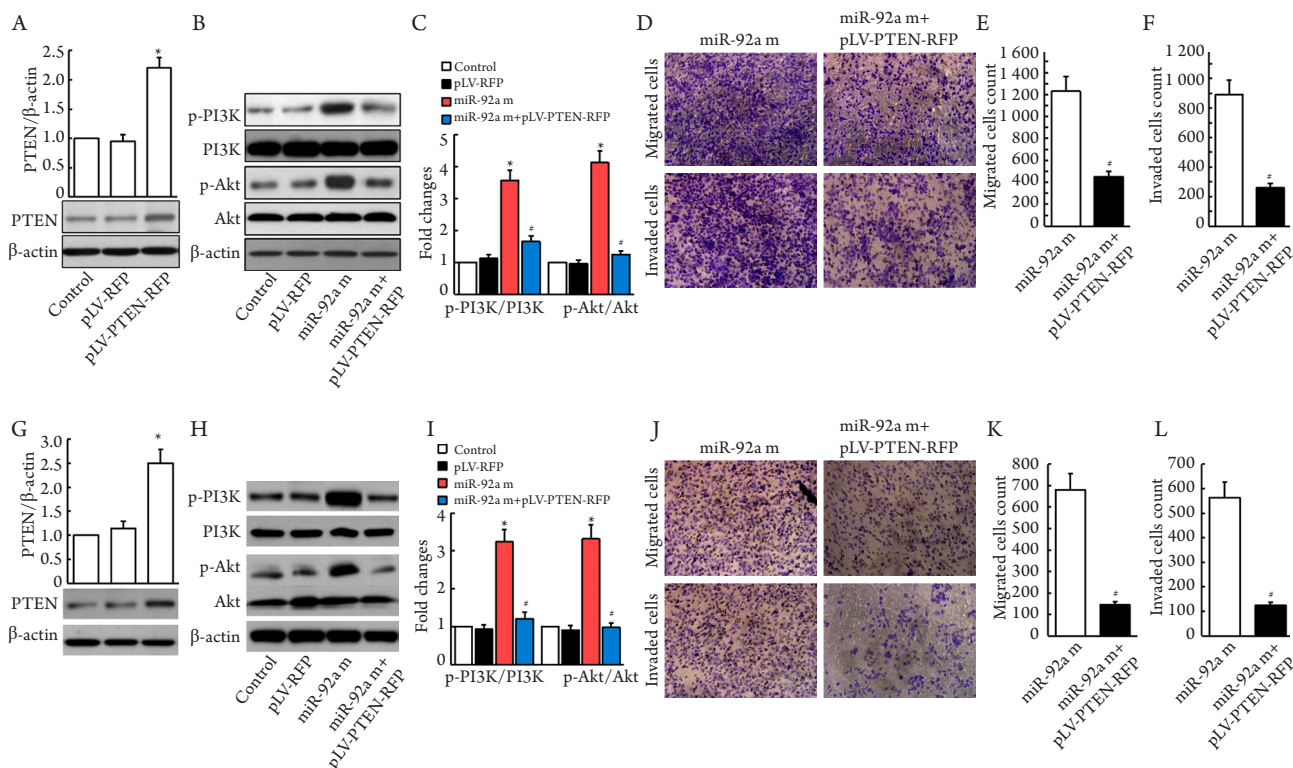


图7 过表达PTEN逆转miRNA-92a诱导的SKOV3和A2780细胞中p-PI3K, p-Akt蛋白水平升高、细胞迁移和侵袭

Figure 7 Over-expression PTEN reverse over-expression miRNA-92a induced higher protein levels of p-PI3K, p-Akt, cell migration and invasion in SKOV3 and A2780 cells

用miRNA-92a mimics和pLV-PTEN-RFP转染SKOV3或A2780细胞48 h后, 检测其蛋白表达、细胞迁移和侵袭情况。(A) pLV-PTEN-RFP在SKOV3细胞中的转染效率;(B, C) SKOV3细胞中的p-PI3K和 p-Akt的蛋白表达水平;(D-F) SKOV3细胞的迁移图像( $\times 200$ )、细胞侵袭图像( $\times 200$ )和统计数据。(G) pLV-PTEN-RFP在A2780细胞中的转染效率;(H, I)A2780细胞中的p-PI3K和 p-Akt的蛋白表达水平;(J-L) A2780细胞的迁移图像( $\times 200$ )、细胞侵袭图像( $\times 200$ )和统计数据。 $n=3$ 。\* $P<0.05$  vs 对照组;  $^{\#}P<0.05$  vs miRNA-92a mimics转染组。

After SKOV3 or A2780 cells were transfected with miRNA-92a mimics and pLV-PTEN-RFP for 48 h, the protein expressions, cell migration and invasion were examined. (A) Transfection efficiency of pLV-PTEN-RFP in SKOV3 cells; (B, C) Protein levels of p-PI3K and p-Akt in SKOV3 cells; (D-F) Cell migration images ( $\times 200$ ), cell invasion images ( $\times 200$ ) and statistical data in SKOV3 cells; (G) Transfection efficiency of pLV-PTEN-RFP in A2780 cells; (H, I) Protein levels of p-PI3K and p-Akt in A2780 cells; (J-L) Cell migration images ( $\times 200$ ), cell invasion images ( $\times 200$ ) and statistical data in A2780 cells.  $n=3$ . \* $P<0.05$  vs control group;  $^{\#}P<0.05$  vs miRNA-92a mimics group.

### 3 讨论

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤, 其病死率位于女性生殖系统肿瘤首位<sup>[1]</sup>。据统计, 我国每年卵巢癌新发病例约13.15万, 发病率是发达国家的6倍<sup>[9]</sup>。卵巢癌极易发生侵袭、转移<sup>[10-11]</sup>。卵巢癌细胞的侵袭、转移正是绝大多数卵巢癌患者死亡的重要原因之一。但, 目前对卵巢癌侵袭转移的机制并不清楚。最近, miRNA-92a在其他肿瘤细胞的侵袭和迁移研究领域表现出良好的研究前

景<sup>[12-18]</sup>。miRNA-92a参与多种肿瘤细胞的恶性生物学行为, 如miRNA-92a在肺癌组织中高表达, 且表达水平与恶性程度相关<sup>[19]</sup>。Hu等<sup>[20]</sup>研究发现miRNA-92a在结直肠癌中的表达水平明显高于癌旁组织, 且与结直肠癌病理分期与预后相关<sup>[21]</sup>。进一步研究发现miRNA-92a直接通过影响PTEN<sup>[13]</sup>, KLF4<sup>[14]</sup>等靶基因影响结直肠癌细胞侵袭性和增殖性。MiRNA-92a在人宫颈癌细胞瘤中高表达, 其侵袭与调节FBXW7表达密切相关<sup>[15]</sup>。虽然miRNA-92a在其他肿瘤中研究较多, 但在卵巢癌中尚不完



善。因此,本研究采用RT-qPCR方法分别检测正常卵巢上皮组织、卵巢癌组织和卵巢良性瘤组织,发现在卵巢恶性病变部位中miRNA-92a呈高表达,提示miRNA-92a可能在卵巢癌组织中具有特异性高表达。本研究把卵巢癌组织分为原发性癌组织和转移性癌组织,发现miRNA-92a在转移性卵巢癌组织表达最高,提示miRNA-92a高表达可能与卵巢癌转移相关。接着本研究选择SKOV3和A2780细胞上,通过转染miRNA-92a inhibitor或mimics后,发现转染miRNA-92a inhibitor后SKOV3和A2780细胞的侵袭与迁移能力均降低,转染miRNA-92a mimics后SKOV3细胞的侵袭与迁移能力均增强。说明miRNA-92a促进卵巢癌细胞侵袭与迁移。

MiRNAs是一类非编码小RNA分子,通过翻译抑制或靶基因mRNAs的剪切来调节基因的表达<sup>[21]</sup>。为此,利用预测靶基因软件miRanda显示PTEN mRNA是miRNA-92a的靶基因,双荧光霉素报告基因同样验证miRNA-92a的靶基因为PTEN mRNA。同样在转移性卵巢癌组织和卵巢癌细胞中发现PTEN mRNA低表达。PTEN是蛋白质酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatases, PTP)基因家族成员,PTEN可能与酪氨酸激酶竞争共同的底物,在肿瘤的发生、发展中起重要作用,它参与调控肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[22-23]</sup>,如过表达PTEN对卵巢癌A2780细胞的侵袭、迁移起负调节作用<sup>[23]</sup>;PTEN在低分化的结直肠癌细胞系RKO细胞过表达可以抑制细胞的侵袭和迁移能力<sup>[24]</sup>;在正常的输卵管上皮细胞敲除PTEN,会引起上皮细胞形态肿瘤样改变,造成细胞迁移能力增加和卵巢肿瘤形成<sup>[25]</sup>;在MDA-MB-231细胞中过表达PTEN,细胞的侵袭和迁移能力受到抑制<sup>[26]</sup>。另外,PTEN可以与PI3K/Akt信号通路共同调节肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移等生物学行为<sup>[26-28]</sup>。本研究发现:转染miRNA-92a inhibitor抑制SKOV3和A2780细胞中p-PI3K与p-Akt的蛋白表达,促进PTEN的蛋白表达;而转染miRNA-92a mimics促进p-PI3K与p-Akt的蛋白表达,抑制PTEN的蛋白表达;同时,本研究采用PTEN敲减的方法也证明了PTEN敲减能加强PI3K/Akt信号活性和促进卵巢癌细胞的侵袭与迁移能力;且过表达PTEN能逆转miRNA-92a mimics的作用。这些结果提示:在卵巢癌细胞中,miRNA-92a可以通过PTEN/PI3K/Akt为轴心的信号通路促进卵巢癌细胞的侵袭与迁移能力。

综上所述,miRNA-92a可作为卵巢癌治疗的一个潜在的标志物,为卵巢癌的靶点治疗提供理论依据。

## 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 277-300.
- Ponnusamy MP, Seshacharyulu P, Lakshmanan I, et al. Emerging role of mucins in epithelial to mesenchymal transition[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(9): 945-956.
- 徐晓芳. 中晚期卵巢癌综合治疗疗效及影响因素[J]. *中国社区医师*, 2017, 33(30): 80-83.  
XU Xiaofang. Efficacy and influencing factors of combined therapy for advanced ovarian cancer[J]. *Chinese Community Physician*, 2017, 33(30): 80-83.
- Klinge CM, Radde BN, Imbert-Fernandez Y, et al. Targeting the intracellular MUC1 C-terminal domain inhibits proliferation and estrogen receptor transcriptional activity in lung adenocarcinoma cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(11): 2062-2071.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- Yao Q, Zhang AM, Ma H, et al. Novel molecular beacons to monitor microRNAs in non-small-cell lung cancer[J]. *Mol Cell Probes*, 2015, 26(5): 182-187.
- Resnick KF, Alder H, Hagan JP, et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform[J]. *Cybernet Oncol*, 2009, 112(1): 55-59.
- Ohyagi-Hara C, Sawada K, Kamiura S, et al. miR-92a inhibits peritoneal dissemination of ovarian cancer cells by inhibiting integrin  $\alpha 5$  expression.[J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(5): 1876-1889.
- Ponnusamy MP, Seshacharyulu P, Lakshmanan I, et al. Emerging role of mucins in epithelial to mesenchymal transition[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(9): 945-956.
- Bacalbasa N, Balescu I, Dima S, et al. Hematogenous splenic metastases as an independent negative prognosis factor at the moment of primary cytoreduction in advanced stage epithelial ovarian cancer-a single center experience[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(10): 5649-5654.
- Di Giorgio A, Cardi M, Biacchi D, et al. Depth of colorectal-wall invasion and lymph-node involvement as major outcome factors influencing surgical strategy in patients with advanced and recurrent ovarian cancer with diffuse peritoneal metastases[J]. *World J Surg Oncol*, 2013, 11: 64.
- Li M, Guan X, Sun Y, et al. miR-92a family and their target genes in tumorigenesis and metastasis[J]. *Exp Cell Res*, 2014, 323(1): 1-6.
- Ke TW, Wei PL, Yeh KT, et al. MiR-92a promotes cell metastasis of colorectal cancer through PTEN-mediated PI3K/AKT pathway[J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22(8): 2649-2655.
- Lv H, Zhang Z, Wang Y, et al. MicroRNA-92a promotes colorectal

- cancer cell growth and migration by inhibiting KLF4[J]. *Oncol Res*, 2016, 23(6): 283-290.
15. Zhou C, Shen L, Mao L, et al. miR-92a is upregulated in cervical cancer and promotes cell proliferation and invasion by targeting FBXW7[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458(1): 63-69.
  16. Zhang GJ, Li LF, Yang GD, et al. MiR-92a promotes stem cell-like properties by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(60): 101760-101770.
  17. Luo S, Li N, Yu S, et al. MicroRNA-92a promotes cell viability and invasion in cervical cancer via directly targeting Dickkopf-related protein 3[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(2): 1227-1234.
  18. Lu C, Shan Z, Hong J, et al. MicroRNA-92a promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in non-small cell lung cancer metastasis[J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(1): 235-244.
  19. Lin HY, Chiang CH, Hung WC. STAT3 upregulates miR-92a to inhibit RECK expression and to promote invasiveness of lung cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(3): 731-738.
  20. Hu S, Liu L, Chang EB, et al. Butyrate inhibits pro-proliferative miR-92a by diminishing c-Myc-induced miR-17-92a cluster transcription in human colon cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 180.
  21. Lin YZ, Ou DL, Chang HY, et al. Simultaneous visualization of the subfemtomolar expression of microRNA and microRNA target gene using HILO microscopy[J]. *Chem Sci*, 2017, 8(9): 6670-6678.
  22. Zhang LL, Liu J, Lei S, et al. PTEN inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer via downregulation of FAK expression[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(5): 1011-1120.
  23. 吴卉娟, 郝权, 王珂, 等. 第10号染色体上磷酸酶和张力蛋白同源缺失的基因对人卵巢癌A2780细胞侵袭和迁移能力的影响及相关机制[J]. *中华肿瘤杂志*, 2011, 33(3): 165-168.  
WU Huijuan, HAO Quan, WANG Ke, et al. Effects of homologous deletion of phosphatase and tensin on the invasion and migration of human ovarian cancer A2780 cells and related mechanisms[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2011, 33(3): 165-168.
  24. Pan S, Deng Y, Fu J, et al. Decreased expression of ARHGAP15 promotes the development of colorectal cancer through PTEN/AKT/FOXO1 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 673.
  25. Tanwar PS, Mohapatra G, Chiang S, et al. Loss of LKB1 and PTEN tumor suppressor genes in the ovarian surface epithelium induces papillary serous ovarian cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(3): 546-553.
  26. Hohensee I, Chuang HN, Grottko A, et al. PTEN mediates the cross talk between breast and glial cells in brain metastases leading to rapid disease progression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 6155-6168.
  27. Li NN, Meng XS, Bao YR, et al. Evidence for the involvement of COX-2/VEGF and PTEN/PI3K/AKT pathway the mechanism of oroxin B treated liver cancer[J]. *Pharmacogn Mag*, 2018, 14(54): 207-213.
  28. Liu J, Chen W, Zhang H, et al. miR-214 targets the PTEN-mediated PI3K/Akt signaling pathway and regulates cell proliferation and apoptosis in ovarian cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 5711-5718.

**本文引用:** 王秋宇, 朱军义, 邓巧子. MiRNA-92a靶向PTEN通过PI3K/AKT信号通路促进卵巢癌细胞转移[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(7): 1658-1667. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.005

**Cite this article as:** WANG Qiyu, ZHU Junyi, DENG Qiaozi. MiRNA-92a promote metastasis in ovarian cancer cells through PI3K/Akt signaling pathway by targeting PTEN[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(7): 1658-1667. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.005