

## miRNA-497 抑制卵巢癌细胞中 FASN 的表达

余丹丹<sup>1</sup>, 张林<sup>1</sup>, 徐晓兰<sup>2</sup>, 吴迪<sup>3</sup>, 沈杨<sup>1</sup>, 田小强<sup>4</sup>, 常立功<sup>3</sup>, 任慕兰<sup>1</sup>, 蔡云朗<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>东南大学附属中大医院妇产科, 江苏 南京 210009; <sup>2</sup>兴化市人民医院妇产科, 江苏 兴化 225700; <sup>3</sup>东南大学医学院, 江苏 南京 210009; <sup>4</sup>南京市第二医院妇产科, 江苏 南京 210009)

**[摘要]** 目的: 研究 miRNA-497 在上皮性卵巢癌组织/细胞中的表达情况, miRNA-497 对脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase, FASN)表达水平的影响, 探讨 miRNA-497 与 FASN 之间的关系, 为临床卵巢癌诊治以及选择性靶向药物应用提供新的实验研究依据。方法: qRT-PCR 分析 10 例上皮性卵巢癌组织及 10 例正常上皮性卵巢组织中 miRNA-497、FASN 的表达水平, Person 相关性分析二者表达水平有无相关性。从卵巢癌细胞株 SKOV3、A2780 中筛选出 miRNA-497 表达量较低的 SKOV3 细胞株, 转染 miRNA-497 mimics、miRNA-497 inhibitor 至卵巢癌细胞株 SKOV3 中, 转染 miRNA-497 mimics control、miRNA-497 inhibitor control 作为阴性对照, 未转染组为空白对照, qRT-PCR 检测不同组中 FASN 的 mRNA 的表达情况, Western blot 分析各组细胞中 FASN 蛋白表达改变情况。结果: ①miRNA-497 在上皮性卵巢癌组织中的表达较正常卵巢组织明显降低, 而 FASN 基因却存在异常高表达; Pearson 相关性分析表明, 卵巢癌组织和正常卵巢组织中 miR-497 与 FASN mRNA 表达存在负相关( $r=-0.45884$ ,  $P < 0.01$ ); ②miRNA-497 可以调控 FASN 的表达。与对照组相比, 增加 miRNA-497 的表达后 FASN 的蛋白及 mRNA 表达水平明显降低; 抑制 miRNA-497 的表达可增加 FASN 蛋白及 mRNA 的表达。结论: miRNA-497 在上皮性卵巢癌组织中的表达较正常卵巢组织明显降低, 而 FASN 基因却存在异常高表达, 二者表达水平存在负相关; miRNA-497 能够抑制卵巢癌 SKOV3 细胞中 FASN 的表达, FASN 可能是 miRNA-497 的靶基因。

**[关键词]** miRNA-497; 卵巢癌; 脂肪酸合成酶

**[中图分类号]** R737.31

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)02-220-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170218

卵巢癌是病死率第一的妇科恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 其病理类型复杂, 具有早期症状隐匿、易于转移和广泛播散的生物学行为, 预后极差。因此探索与卵巢癌的发生密切相关的基因并深入研究其机制具有重要的科学意义。

肿瘤的恶性行为与其特殊的物质代谢和能量代谢密切相关, 脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase, FASN)是其中重要的功能酶, FASN 不但能够参与能量代谢调节, 并能够调节细胞内信号的转导。FASN 在正常的组织中不表达或微量表达<sup>[2]</sup>, 在恶性肿瘤中<sup>[3]</sup>异常表达, 且与肿瘤的发生与进展密切相关。近年研究表明, 在卵巢癌中, FASN 基因的表达情况可能在肿瘤发生与进展中发挥了重要作用。但是何种原因导致 FASN 基因异常高表达, 目前尚不清楚。因此, 探索导致 FASN 基因在卵巢癌中异常高表达的机制, 不但具有重要的科学意义, 也为卵巢癌分子靶向治疗提供潜在新靶标。

研究显示 DNA 的异常甲基化及 miRNA 的异常表达参与了各种肿瘤的发生及发展<sup>[4]</sup>。miRNA-497 位于人类 17p13.1 染色体, 属 miRNA-15/16/

195/424/497 家族。miRNA-497 作为抑癌基因/癌基因在很多肿瘤中发挥作用<sup>[5]</sup>。miRNA-497 的异常表达可以调控重要肿瘤相关基因的表达, 参与细胞增殖、分化、凋亡等多种重要细胞活动, 与肿瘤发生发展、侵袭转移有密切关系。因此, 探索 miRNA-497 在卵巢癌中的作用, 不但具有重要的科学意义, 也为卵巢癌分子靶向治疗提供潜在新靶标。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

共收集 2012 年 10 月至 2013 年 6 月中大医院行手术治疗的 10 例卵巢癌组织及对应正常卵巢组织标本, 20 例均有完整病史资料, 术前均未经放疗或化疗, 全部病例均经病理专家诊断证实。获取新鲜上皮性卵巢癌组织及对应正常卵巢组织切除标本, 离体后尽快取材, 肉眼剔除组织的坏死部分、肌肉及脂肪, 将标本放入 -80℃ 低温冰箱备用。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 细胞培养

人卵巢浆液性乳头状囊腺癌细胞顺铂敏感株

SKOV3 (北京市肿瘤医院药物研究所); 人卵巢癌 A2780 细胞(南京凯基生物生物技术公司)。卵巢癌细胞株 A2780、SKOV3 细胞均采用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,均在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养,根据细胞生长的状态每 1~3 d 换液。

### 1.2.2 总 RNA 提取

将标本放在盛有液氮的研钵中碾碎,移入放有 1 mL TRIzol 试剂(江苏碧云天生物技术研究所)的离心管,利用高速匀浆机(Hermle 公司,德国)将组织进一步粉碎,室温放置 5 min 后,4℃、12 000 r/min 离心 5 min,离心后将上清吸入新 EP 管中,加入 0.2 mL 的氯仿,室温下颠倒混匀 15 s 后室温静置 5 min,4℃、12 000 r/min 离心 15 min,离心后将上清吸入新 EP 管中,利用异丙醇沉淀 RNA,室温静置 10 min,再以 4℃、12 000 r/min 离心 10 min;离心后弃去上清,以冷乙醇清洗沉淀,在空气条件下等待沉淀干燥后,加入二乙基焦磷酸酰胺处理的三蒸水溶解,利用紫外分光光度计对提取的总 RNA 进行纯度和含量鉴定。

### 1.2.3 qRT-PCR 反应

引物设计和合成:参照文献,相关引物设计如下:miRNA-497 上游:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';miRNA-497 下游:5'-TAGCCTGCAGCACACTGTGGT-3';U6 上游:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3';U6 下游:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3';FASN 上游:5'-AAGCAGGCACACACGATGG-3';FASN 下游:5'-CTGCGGCTGCTGCTGGAA-GTCACC-3'; $\beta$ -actin 上游:5'-TGCCCATCTACGAGGGGTATG-3'; $\beta$ -actin 下游:5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTC-3'。相关引物由南京金瑞斯生物技术有限公司合成。

qRT-PCR 测定:反应体系:AcetmqPCR SYBR Green Master Mix 10  $\mu$ L、上游引物 0.4  $\mu$ L、下游引

物 0.4  $\mu$ L、ROX Reference Dye 15  $\mu$ L、模板 DNA 5  $\mu$ L,总体积 20  $\mu$ L。反应条件:94℃ 30 s,60℃ 60 s,40 个循环(南京诺唯赞生物科技有限公司)。计算公式: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{对照目的}} - Ct_{\text{对照内参}}) - (Ct_{\text{实验目的}} - Ct_{\text{实验内参}}) = X$ ,则对照组目标基因的表达水平是实验组目标基因的  $2^{-X}$  倍。

### 1.2.4 Western blot

miRNA-497 相关小分子转染 48 h 后,收集细胞,制备 SDS-PAGE 样品。Western blot 检测 SKOV3 细胞中 FASN 的表达变化。配置分离胶(60 g/L)和浓缩胶(50 g/L)。等量样品经 SDS-PAGE 电泳后,稳流将蛋白转至甲醇预处理的 PVDF 膜上(电转 6 h)。转膜、封闭后按流程分别加入一抗(1:1 000)和二抗(1:500)。暗室中发光、显影和定影。

### 1.3 统计学方法

数据采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,应用 Excel 绘制图表,各指标以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组间比较采用 *t* 检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

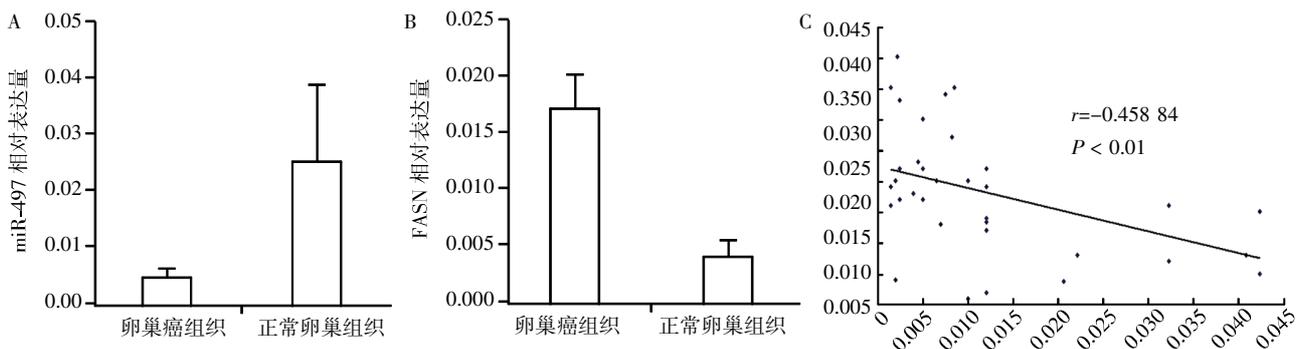
## 2 结 果

### 2.1 miRNA-497 和 FASN 在卵巢癌组织中的表达

10 例上皮性卵巢癌组织及相关正常卵巢组织中的 qRT-PCR 检测结果表明 miRNA-497 在上皮性卵巢癌组织中的表达较正常卵巢组织明显降低,而 FASN 基因却存在异常高表达;Pearson 相关性分析表明,卵巢癌组织和正常卵巢组织中 miRNA-497 与 FASN mRNA 表达存在负相关( $r = -0.458 84, P < 0.01$ ,图 1)。

### 2.2 miRNA-497 可以抑制 FASN 的表达

前期从上皮性卵巢癌细胞株 SKOV3、A2780 中筛选出 miRNA-497 表达量较低的 SKOV3 细胞株。经不同条件处理后各实验组 qRT-PCR 及 Western



Pearson 相关性分析表明,上皮性卵巢癌组织和正常卵巢组织中 miRNA-497 与 FASN 中 mRNA 表达存在负相关( $r = -0.458 84, P < 0.01$ )。

图 1 qRT-PCR 检测不同卵巢组织中 miRNA-497、FASN 的相对表达量

blot 结果分析:miRNA-497 mimics 组中 FASN 的 mRNA 和蛋白的水平少于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而 miRNA-497 inhibitor 组中 FASN 的 mRNA 和蛋白表

达水平却是升高的( $P < 0.05$ ), 这表明在卵巢癌细胞中, 转染 miRNA-497 后可降低 FASN 的 mRNA 和蛋白表达水平(图 2)。

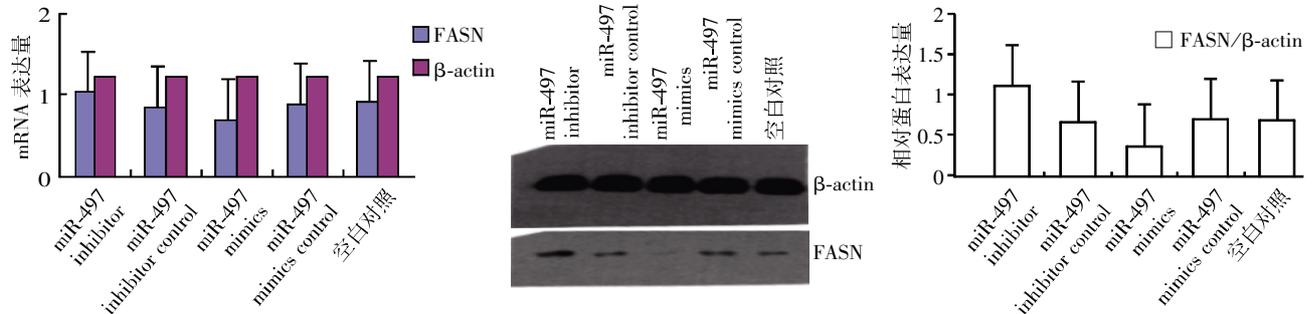


图 2 qRT-PCR 和 Western blot 测定各组细胞中 FASN 蛋白的表达水平

### 3 讨论

卵巢癌是女性生殖系统常见肿瘤之一,其病死率占妇科恶性肿瘤的第一位,因此探索与卵巢癌的发生密切相关的基因并深入研究其机制具有重要的科学意义。目前随着对于 miRNA 分子调控网络研究的不断深入,miRNA 与卵巢癌发生发展之间的关系已有相关文献报道。Iorio 等<sup>[6]</sup>发现 miRNA 在卵巢癌的分子分型中有着重要的意义;Zhang 等<sup>[7]</sup>发现 miRNA-127、miRNA-15a、miRNA-34a、miRNA-34 b 的下调与卵巢癌的发生有着密切关系,Yang 等<sup>[8]</sup>证明卵巢癌中下调的 miRNA-214 可以影响卵巢癌细胞的增殖和耐药性,Dahiya 等<sup>[9]</sup>表明卵巢癌中 miRNA-21 可以调控对卵巢癌发生起重要作用的 BCL-2、PTEN、PDCD4 等基因的表达。上述结果表明 miRNA 对于卵巢癌发生发展等过程中的关键分子具有重要调控作用,存在多种调控机制,仍需进一步研究。

miRNA-497, 属于 miRNA-15/16/195/424/497 家族。该家族成员作用多样,具有某种细胞种类特异性。近些年来,文献报道 miRNA-497 在结肠癌<sup>[5]</sup>、乳腺癌<sup>[10]</sup>、非小细胞型肺癌<sup>[11]</sup>等肿瘤中表达下调,通过调控靶基因 IGF1-R、BCL-W、HDGF 等的表达而影响肿瘤的发生、发展。Bhattacharya 等<sup>[12]</sup>研究发现,若下调 miRNA-15a 和 miRNA-16 在卵巢癌细胞中的表达,卵巢癌细胞的分化与增殖水平也会相应增加。为研究本家族成员 miRNA-497 与卵巢癌发生发展的关系,本研究采用 qRT-PCR 法检测了 10 例上皮性卵巢癌组织及相关正常卵巢组织中 miRNA-497 的表达,结果显示 miRNA-497 在上皮性卵巢癌组织中的表达较正常卵巢组织明显降低,这提示 miRNA 在卵巢癌发生发展中可能扮演着“抑癌基

因”的角色,属于与卵巢癌发生相关的调控分子,但对于卵巢癌生物学性质的影响仍需进一步研究证明。现针对肿瘤中 miRNA 表达调控的机制问题,目前的讨论主要集中在两个方面:基因突变<sup>[13]</sup>和启动子甲基化<sup>[14]</sup>。miRNA-497 位于人类染色体 17q13.1 位点,该位点是基因缺失和突变的高发区<sup>[15]</sup>。但进一步检索结果提示 miRNA-497 基因序列并不在已报道的卵巢癌基因缺失的区段,因此本课题组之后将把重点放在研究 iRNA-497 的基因突变上。此外,有研究发现 miRNA-195 的启动子区域存在 CpG 岛,而 miRNA-497 与其共用相同的启动子,这表明 miRNA-497 启动子区域可能存在甲基化位点。因此,基因突变及启动子甲基化均有可能参与 miRNA-497 在卵巢癌中的调控,但具体机制还需进一步研究。

现已证明 FASN 在卵巢癌的发生、进展、侵袭和转移等方面有重要作用<sup>[16]</sup>。而对于 FASN 过表达机制的研究错综复杂,主要包括转录水平调节、翻译后水平调节以及细胞外肿瘤微环境切应力改变等<sup>[16-17]</sup>。Mao 等<sup>[18]</sup>研究表明,在骨肉瘤中,miRNA-195 通过与 FASN 的 3'UTR 直接结合而负向调控 FASN 的表达,表明 miRNA 可以在转录后水平对 FASN 基因的表达进行调控。本实验通过相关性分析发现上皮性卵巢癌组织和正常卵巢组织中 miR-497 与 FASN mRNA 表达存在负相关 ( $r = -0.45884, P < 0.01$ ),这提示 FASN 可能是 miRNA-497 的靶基因。进一步实验表明,转染 miRNA-497 后可降低 FASN 的表达水平,这表明卵巢癌中 miRNA-497 可以调控 FASN 的表达水平,FASN 是 miRNA-497 的靶基因。miRNA-497 与 FASN 之间相互作用的机制较为复杂,其中可能存在直接与 FASN 的 3'UTR 结合而出现 FASN

表达的抑制,也可能存在其他途径的作用影响 FASN 的表达,其潜在的机制需要进一步深入研究。而 FASN 可以通过调节 PI3K/AKT 通路等机制发挥其作用,miRNA-497 是否与 PI3K/AKT 通路存在相关性仍需进一步研究。

综上所述,本研究显示 miRNA-497 在上皮性卵巢癌组织中的表达较正常卵巢组织明显降低,而 FASN 基因却存在异常高表达,而且 miR-497 与 FASN mRNA 的表达水平存在负相关。进一步研究发现,miRNA-497 可以抑制 FASN 的表达,提示 miRNA-497 在卵巢癌的发生发展过程中起重要作用。这表明 miRNA-497 可能是卵巢癌分子靶向治疗的潜在新靶标,但是具体作用机制仍需进一步研究。

这一结果丰富了卵巢癌相关 miRNA 理论,为进一步理解卵巢癌的病因、寻找理想的标记物并探索基因治疗提供了有用的靶点,从而为提高卵巢癌诊治水平提供可靠的线索。

#### [参考文献]

- [1] Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics,2013 [J]. CA Cancer J Clin,2013,63(1):11-30
- [2] Menendez JA,Lupu R. Oncogenic properties of the endogenous fatty acid metabolism;molecular pathology of fatty acid synthase in cancer cells [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care,2006,9(4):346-357
- [3] Nan Li,Bu X,Wu P,et al. The “HER2 - PI3K/Akt - FASN axis” regulated malignant phenotype of colorectal cancer cells[J]. Lipids,2012,47(4):403-411
- [4] Lovat F,Valeri N,Croce CM. microRNAs in the pathogenesis of cancer [J]. Semin Oncol,2011,38 (6):724-733
- [5] Guo ST,Jiang CC,Wang GP,et al. MicroRNA-497 targets insulin-Like growth factor 1 receptor and has a tumour suppressive role in human colorectal cancer [J]. Oncogene,2013,32(15):1910-1920
- [6] Lorio MV,Visone R,DiLeva G,et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer[J]. Cancer Res,2007,67(18):8699-8707
- [7] Neetu D,Chery A,Kim SW,et al. MicroRNA expression profiles in serous ovarian cancer [J]. PLoS One,2008,3 (6):e2436
- [8] Yang N,Kaur S,Volinia S,et al. MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer [J]. Cancer Res,2008,68(24):10307-10314
- [9] Dahiya,Sherman-Baust N,Wang CA,et al. Repertoire of microRNAs in epithelial ovarian Cancer as determined by next generation sequencing of small RNA cDNA libraries [J]. PLoS One,2009,4(4):e5311
- [10] Shen L,Li J,Xu L,et al. miR-497 induces apoptosis of breast cancer cells by targeting Bcl-w[J]. Exp Ther Med,2012,3(3):475-480
- [11] Zhao WY,Wang Y,An ZJ,et al. Downregulation of miR-497 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting HDGF in non-small cell lung cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun,2013,435(3):466-471
- [12] Bhattacharya R,Nicoleo M,Arvize R,et al. MiR-15a and MiR-16 control Bmi-1 expression in ovarian cancer [J]. Cancer Res,2009,69(23):9090-9095
- [13] Ryu S,Joshi N,McDonnell K,et al. Discovery of novel human breast cancer microRNAs from deep sequencing data by analysis of pri-microRNA secondary structures [J]. PLoS One,2011,6(2):e16403
- [14] Cheung HH,Davis AJ,Lee TL,et al. Methylation of an intronic region regulates miR-199a in testicular tumor malignancy[J]. Oncogene,2011,30(31):3404-3415
- [15] Flavin RJ,Smyth PC,Laios A,et al. Potentially important microRNA cluster on chromosome 17q13.1 in primary peritoneal carcinoma[J]. Mod Pathol,2009,22(2):197-205
- [16] Kuhajda FP. Fatty acid synthase and cancer:new application of an old pathway[J]. Cancer Res,2006,66(12):5977-5980
- [17] Menendez JA,Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis [J]. Nat Rev Cancer,2007,7(10):763-777
- [18] Mao JH,Zhou RP,Peng AF,et al. microRNA-195 suppresses osteosarcoma cell invasion and migration in vitro by targeting FASN[J]. Oncol Lett,2012,4(5):1125-1129

[收稿日期] 2016-02-13