

miR-125b 通过 CDK14 对上皮性卵巢癌细胞增殖和侵袭的影响

刘孟彬, 张少华*

作者单位: 430050 湖北 武汉, 武汉亚心总医院妇产科

作者简介: 刘孟彬, 青海大学博士研究生在读, 主治医师, 主要研究方向为卵巢癌患者全基因组测序个体化治疗

* 通信作者, E-mail: vrjrh@163.com

【摘要】目的 探讨 miR-125b 对 CDK14 的靶向作用及其对上皮性卵巢癌 (epithelial ovarian cancer, EOC) 细胞增殖和侵袭的影响。**方法** 用 RT-PCR 法检测 EOC 细胞系 (OVCAR3、HO8910、SKOV3) 和人卵巢上皮细胞 (HOSEpiC) 中 miR-125b 的表达情况。用 CCK-8 法和菌落形成实验检测细胞增殖活性; 细胞划痕试验和 Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力。采用双荧光素酶报告基因分析方法验证 miR-125b 对 CDK14 的靶向作用。**结果** HOSEpiC 的 miR-125b 相对表达量明显高于 EOC 细胞系中的 3 种细胞 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 用 miR-125b 干预 EOC 细胞系后, 细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显降低 ($P < 0.05$)。用 miR-125b inhibitor 干预后, 细胞的增殖、侵袭和迁移能力明显增强 ($P < 0.05$)。与对照组相比, miR-125b 过表达组的 CDK14 表达更低 ($P < 0.05$), miR-125b inhibitor 组的 CDK14 表达更高 ($P < 0.05$), CDK14 过表达组的细胞增殖能力和侵袭能力更强 ($P < 0.05$)。**结论** miR-125b 可通过靶向 CDK14 而抑制 EOC 细胞的增殖和侵袭。

【关键词】 miR-125b; CDK14; 上皮性卵巢癌; 增殖; 侵袭; 迁移; 凋亡

【中图分类号】 R 737.31

【文献标志码】 A

【文章编号】 1674-4020(2024)04-027-05

doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2024.04.06

Effect of miR-125b on proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells via CDK14

Liu Mengbin, Zhang Shaohua*

Department of Obstetrics and Gynecology, Wuhan Yaxin General Hospital, Wuhan Hubei 430050, P. R. China

* Corresponding author, E-mail: vrjrh@163.com

【Abstract】Objective To investigate the targeting effect of miR-125b on CDK14 and its effect on proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer (EOC) cells. **Methods** RT-PCR was used to detect the expression of miR-125b in EOC cell lines (OVCAR3, HO8910, SKOV3) and human ovarian epithelial cells (HOSEpiC). CCK-8 assay and colony formation assay were used to detect cell proliferation activity, and cell scratch test and Transwell chamber were used to detect cell migration and invasion ability. Double luciferase reporter gene analysis was used to verify the targeting effect of miR-125b on CDK14. **Results** The relative expression of miR-125b in HOSEpiC was significantly higher than that in the three EOC cell lines ($P < 0.05$). Compared with the control group, the proliferation, migration and invasion ability of EOC cell lines were significantly decreased after treatment with miR-125b ($P < 0.05$). After intervention with miR-125b inhibitor, the proliferation, invasion and migration of cells were significantly enhanced ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of CDK14 in miR-125b overexpression group was lower ($P < 0.05$), the expression of CDK14 in miR-125b inhibitor group was higher ($P < 0.05$), the cell proliferation and invasion ability of CDK14 overexpression group was stronger ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-125b can inhibit the proliferation and invasion of EOC cells by targeting CDK14.

【Key words】 miR-125b; CDK14; epithelial ovarian cancer; proliferation; invasion; migration; apoptosis

卵巢癌是全球女性第7大最常见的癌症。据报道,2018年全球新发卵巢癌约24万例。近年来卵巢癌相关的研究不断深入,但是患者的5年生存率仍未见明显改善^[1]。因此,寻找与卵巢癌诊断、治疗和预后有关的新生物学指标迫在眉睫。微小RNA(miRNA)是一类由内源基因编码的长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子,可以参与转录后基因表达的调控^[2]。近年来,越来越多的研究发现miRNA与卵巢癌的发生、发展有关^[3]。朱滔等^[4]采用TaqMan低密度微阵列芯片技术筛查了135例卵巢癌患者,发现miR-125b在卵巢恶性肿瘤患者血清中的表达有差异,早期卵巢癌患者血清miR-125b表达水平明显高于晚期患者。该研究还发现,血清miR-125b高水平表达有利于延长卵巢癌患者的无进展生存期,提示该基因与卵巢癌的预后密切相关。miR-125b作用于卵巢癌的具体生物学机制目前尚未明了,既往报道较少。CDK14是一种新发现的细胞周期蛋白依赖性激酶,与卵巢癌细胞的增殖和侵袭密切相关^[5]。本研究旨在探讨miR-125b对CDK14的靶向调控作用及其对上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)细胞增殖和侵袭的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞

EOC细胞系(OVCAR3、HO8910、SKOV3)和人卵巢上皮细胞(HOSEpiC)购于南京科佰生物科技有限公司,培养于含10%胎牛血清(上海联合赛尔生物工程有限公司)和1%青霉素/链霉素溶液的RPMI 1640培养基(上海联合赛尔生物工程有限公司)中,培养环境为37℃、5%CO₂。

1.2 慢病毒感染的寡核苷酸转染

将人pri-miR-125b序列克隆至pWPXL慢病毒载体(长沙优宝生物科技有限公司),然后用Lipofectamine 2000(美国英杰生命技术有限公司)将序列与包装质粒(psPAX2、pMD2G)共转染至HEK 293细胞。病毒颗粒转染48 h后收集,标记为Lv-miR-125b。miR-125b mimics、miR-125b inhibitor(miR-125b -in)及其对应的阴性对照RNA(NC)均购于上海生物工程有限公司。

1.3 构建质粒

将CDK14的编码序列(CDS)克隆至pCDNA3.1(+)载体中(美国英杰生命技术有限公司),生成pCDNA3.1-CDK14。将CDK14 3'UTR片段插入psiCHECK-2载体(美国普洛麦格公司)中荧光素酶基因的下游,该片段为野生型(WT)3'UTR。通过对miR-125b结合位点的种子区进行突变,建立相应的突变结构。

1.4 RT-PCR检测

用Trizol试剂盒(齐一生物科技有限公司)提取

RNA,逆转录后进行RT-PCR检测。引物序列由北京优博兰基因技术有限公司设计并提供。每个样本最少重复3次,设置3个复孔。RT-PCR反应条件为:预变性95℃ 30 s;PCR反应95℃ 5 s,60℃ 30 s,共计40个循环。以GAPDH为内参, $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{转染组}} - \Delta Ct_{\text{空白组}}$,则目的基因相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。7900HT荧光定量PCR仪为美国应用生物系统公司生产。

1.5 细胞增殖试验、菌落形成试验和细胞周期分析

使用CCK-8试剂盒(上海新睿生物科技有限公司)检测细胞活性,将细胞以 $5 \times 10^3/\text{mL}$ 的密度接种在96孔板中,培养24 h、48 h、72 h和96 h后,向每孔中添加10 μL CCK-8,继续培养4 h。用微孔板阅读器(北京博润莱特科技有限公司)490 nm波长处读取吸光度。菌落形成实验中,细胞以300细胞/孔接种在6孔培养板中,用结晶紫染色后测定每孔的菌落数,仅计数直径 $>40 \mu\text{m}$ 的菌落^[6]。细胞周期分析:将细胞培养在6孔培养皿中,经过孵育、离心、PBS洗涤等步骤后,在细胞悬液中加入10 μL 碘化丙啶,反应10 min,采用流式细胞仪(美国BD公司)对细胞凋亡率进行分析。

1.6 细胞划痕试验和Transwell小室检测

待转染后细胞达到80%融合时,采用移液枪头沿着培养板底端划一字型划痕,用PBS冲洗,换无血清培养基进行培养,培养48 h在显微镜下测量划痕宽度。细胞迁移率 = $(1 - \text{测量时划痕宽度} / \text{初始划痕宽度}) \times 100\%$ ^[7]。Transwell小室检测侵袭能力:用无血清培养液细胞浓度调整至 2×10^5 个/mL,取0.2 mL到Transwell小室,加入10%胎牛血清0.5 mL到室下,待贴壁后更换上室培养液,置于细胞培养箱中24 h后取出,用无菌棉签拭去小室滤膜上的细胞,PBS洗涤后用甲醛固定15 min,HE染色,光镜下统计膜背面侵袭的细胞数^[8]。

1.7 western-blotting检测

取对数生长期细胞加入蛋白裂解液,冰上裂解25 min后,15 000转/min离心15 min,将上清液转移至EP管中。样品中加入SDS缓冲液煮沸5 min使蛋白变性。经凝胶电泳(SDS-PAGE)后将蛋白转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉封闭1 h,孵育一抗(美国abcam公司),4℃过夜,弃去一抗,TBST洗膜3次,每次5 min。室温孵育二抗(美国abcam公司)2 h,弃去二抗,TBST洗膜3次,每次5 min。最后在Image Quant^{MT} LAS4000系统上成像。

1.8 荧光素酶报告分析

HEK293细胞接种在24孔板中,与野生型或突变型报告载体和miR-125b mimics或NC-RNA共转染。转染48 h后采集细胞,用双荧光素酶报告分析系统

(Promega)测定荧光素酶活性。

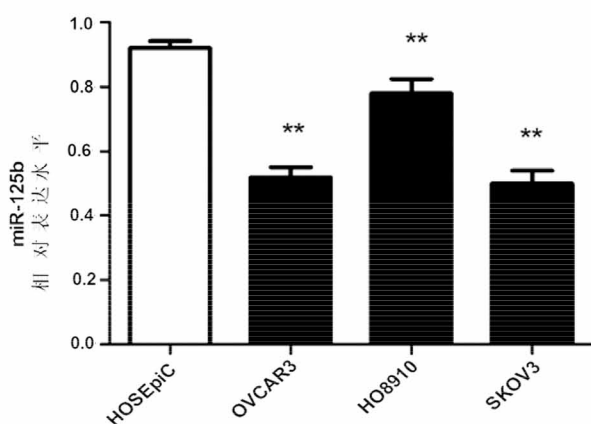
1.9 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行数据分析,采用独立样本 t 检验或重复测量方差分析(两两比较用 $LSD-t$ 法), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-125b 在 EOC 细胞中的表达情况

RT-PCR 检测结果显示,人卵巢上皮细胞 HOSEpiC 的 miR-125b 相对表达量明显高于 EOC 细胞(OVCAR3、HO8910、SKOV3),差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



注:与 HOSEpiC 细胞比较,** $P < 0.01$

图 1 RT-PCR 检测 EOC 细胞系中 miR-125b 的相对表达量

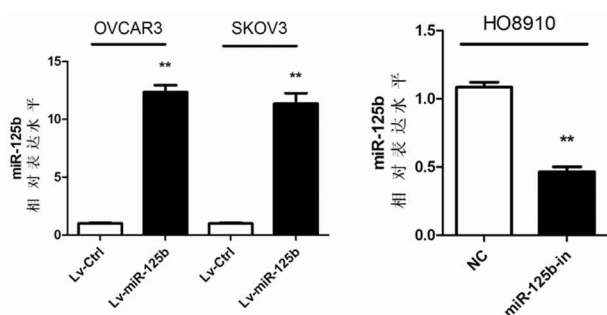
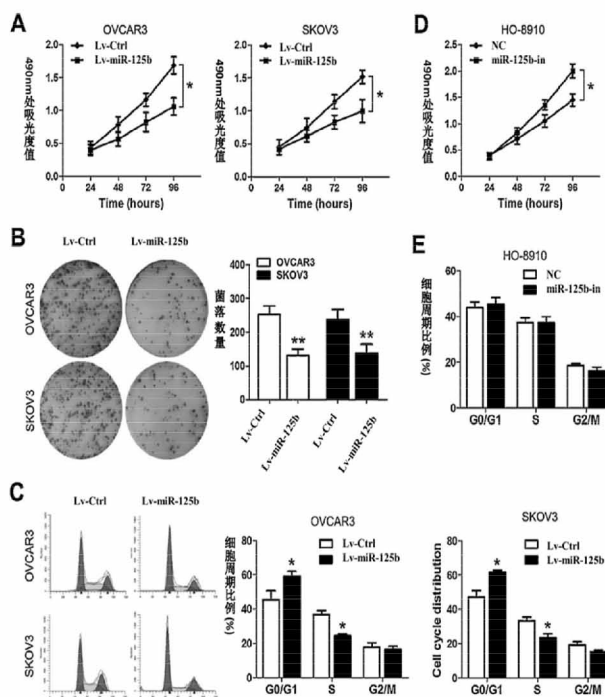


图 2 RT-PCR 检测过表达 miR-125b 的 OVCAR3 和 SKOV3 细胞,抑制 miR-125b 表达的 HO8910 细胞(** $P < 0.01$)

2.2 miR-125b 抑制 EOC 细胞的增殖

将表达 miR-125b 的重组慢病毒载体转染至 OVCAR3 细胞和 SKOV3 细胞。RT-PCR 检测结果显示,转染后 miR-125b 表达水平升高($P < 0.05$),而转染 miR-125b inhibitor 后,HO-8910 细胞 miR-125b 表达水平降低($P < 0.05$),见图 2。CCK-8 检测结果显示 miR-125b 过表达细胞的生长速度明显减慢($P < 0.05$),见图 3A,这与菌落形成试验结果一致(图 3B)。流式细胞术检测结果显示,miR-125b 过表达的 OVCAR3、SKOV3 细胞在

G1/G0 比例明显比对照组高($P < 0.05$),而 S 期比例明显低于对照组($P < 0.05$),见图 3C。用 miR-125b inhibitor 干预后,HO-8910 细胞增殖能力明显增强($P < 0.05$,图 3D),未发现 HO-8910 细胞周期停滞(图 3E)。



注:(A) CCK-8 法检测转染 Lv-Ctrl 或 Lv-miR-125b 的 OVCAR3 和 SKOV3 细胞。(B) 转染 Lv-Ctrl 或 Lv-miR-125b 的 OVCAR3 和 SKOV3 细胞的菌落分析。(C) 转染 Lv-Ctrl 或 Lv-miR-125b 的 OVCAR3 和 SKOV3 细胞的周期分析。(D) 用 CCK-8 法检测 miR-125b inhibitor 或 NC 转染的 HO8910 细胞。(E) 转染 miR-125b inhibitor 或 NC 的 HO8910 细胞的周期分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

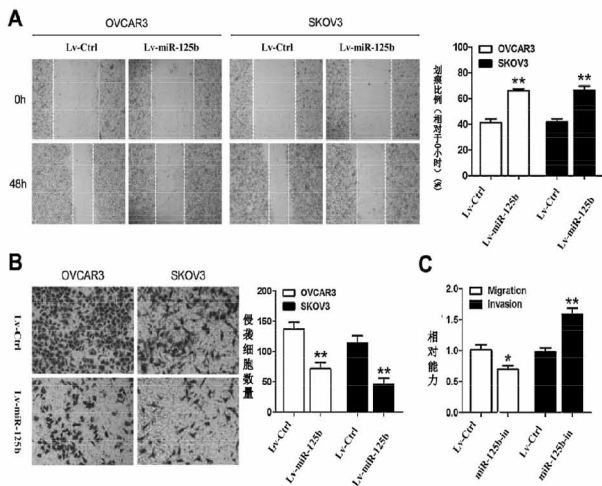
图 3 miR-125b 抑制 EOC 细胞的增殖

2.3 miR-125b 抑制 EOC 细胞迁移和侵袭

细胞划痕试验实验结果显示,过表达 miR-125b OVCAR3 和 SKOV3 细胞的迁移能力明显低于对照组($P < 0.05$),见下页图 4A。Transwell 小室检测结果显示,过表达 miR-125b 后 OVCAR3 和 SKOV3 细胞的侵袭能力明显下降($P < 0.05$),见下页图 4B。转染 miR-125b inhibitor 后,HO-8910 细胞的迁移和侵袭能力明显增加($P < 0.05$),见下页图 4C。

2.4 miR-125b 对 CDK14 的靶向作用分析

Target Scan (www.targetscan.org) 预测结果显示,CDK14 是 miR-125b 的潜在靶基因(下页图 5)。荧光素酶报告基因检测结果显示,miR-125b 过表达抑制了野生型(WT)而非突变型(MUT) CDK14 3' UTR 的荧光素酶活性(下页图 6A)。此外,RT-PCR 和 western-blotting 检测结果显示,miR-125b 过表达抑制了 CDK14 mRNA 和蛋白的表达,miR-125b inhibitor 组的 CDK14 表达更高($P < 0.05$)(下页图 6B、C)。



注:(A)转染 Lv-miR-125b 或 Lv-Ctrl 后的 OVCAR3、SKOV3 细胞划痕实验。(B)转染后 OVCAR3 和 SKOV3 细胞的 Transwell 小室检测。(C)转染 miR-125b inhibitor 或 NC 后的划痕实验和 Transwell 小室检测。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图4 miR-125b 抑制 EOC 细胞的迁移和侵袭

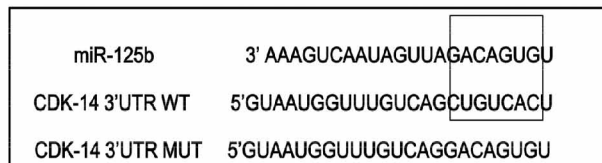
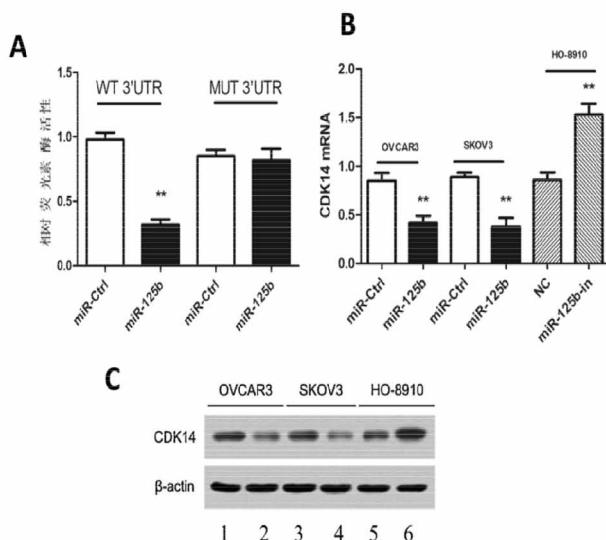


图5 miRNA-125b 在 CDK-14 基因 3' UTR 有相应结合位点



注:(A)荧光素酶报告基因检测结果。(B)RT-PCR 检测转染 miR-125b 或 miR-Ctrl 后 OVCAR3、SKOV3 细胞中 CDK14 mRNA 的表达,转染 miR-125b inhibitor 或 NC 后 HO-8910 细胞中 CDK14 mRNA 的表达。(C)western-blotting 检测转染 miR-125b 或 miR-Ctrl 后 OVCAR3、SKOV3 细胞中 CDK14 蛋白的表达,转染 miR-125b inhibitor 或 NC 后 HO-8910 细胞中 CDK14 蛋白的表达(1 和 3 为 miR-Ctrl,2 和 4 为 miR-125b,5 为 NC,6 为 miR-125b-in)。** $P < 0.01$

图6 miR-125b 靶向 CDK14 基因

2.5 CDK14 与 miR-125b 诱导的 EOC 细胞增殖和侵袭有关

使用携带 CDK14 质粒增强 miR-125b 过表达的 OVCAR3、SKOV3 细胞(图 7A)。随后对这些细胞进行 CCK-8 实验和 Transwell 小室检测,结果显示,CDK14 过表达促进了细胞的增殖和侵袭,即 CDK14 逆转了 miR-125b 的作用(图 7B、C)。

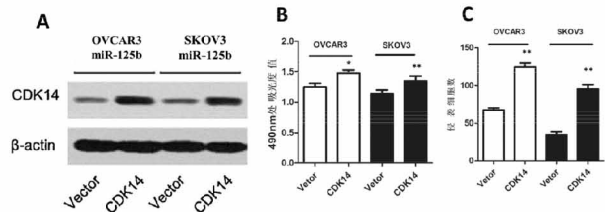


图7 CDK14 对 EOC 细胞生物学行为的影响

3 讨论

miR-125b 是与肿瘤密切相关的 mRNA,与肝癌^[9]、大肠癌^[10]、甲状腺癌^[11] 和胃癌^[12] 等发生和发展有关。近年来,越来越多研究发现 miR-125b 在卵巢癌的发病中占有重要地位。Zhu 等^[13] 发现,EOC 患者外周血 miR-125b 高表达水平与患者无进展生存率和总生存率呈正相关。沈文静等^[14] 发现,miR-125b 在 EOC 组织中的表达水平明显低于正常组织,并且其与临床分级和预后有关。本研究同样发现,EOC 细胞(OVCAR3、HO8910、SKOV3)miR-125b 的表达水平低于正常卵巢上皮细胞。这说明 miR-125b 在 EOC 发生和发展中发挥重要作用,既往关于 miR-125b 调控 EOC 生物学机制的研究较少。本研究发现,miR-125b 可通过靶向 CDK14 影响 EOC 细胞的增殖和侵袭。

CDK14(也被称为 PFTK1)是细胞周期蛋白依赖性激酶,是 Cdc2 家族成员之一。CDK14 具有调节细胞周期的功能,与肝癌、乳腺癌、非小细胞肺癌和胰腺癌等的发生发展密切相关^[15-18]。近年来,越来越多研究证实 CDK14 与 EOC 密切相关。Zhang 等^[19] 发现,CDK14 在 EOC 细胞中高度表达,敲除 CDK14 后 EOC 细胞的增殖、侵袭和迁移能力明显下降。Li 等^[20] 发现 miR-542-3p 可以靶向 CDK14,进而抑制 EOC 细胞的增殖、侵袭和肿瘤生长。那么 miR-125b 是否能靶向作用于 CDK14 而影响 EOC 细胞的生物学行为? 本研究流式细胞术检测结果显示,miR-125b 过表达的 OVCAR3、SKOV3 细胞在 G1/G0 比例明显较高,而 S 期比例明显较低,说明 miR-125b 可能通过影响细胞周期而影响 EOC 细胞的生物学行为。为进一步分析 CDK14 在 miR-125b 发挥生物学作用中的意义,本研究采用生物信息学方法验证了 miR-125b 与 CDK14 的关系,首先我们采用 Target Scan 进行预测,发

现 miRNA-125b 在 CDK14 基因 3' UTR 有相应结合位点。随后,荧光素酶活性检测结果显示,miR-125b 过表达抑制了野生型而非突变型 CDK14 3' UTR 的荧光素酶活性。另外,RT-PCR 和 western-blotting 检测结果均显示 miR-125b 过表达抑制了 CDK14 mRNA 和蛋白的表达,说明 CDK14 是 miR-125b 的直接靶点。在后续生物学实验中,本研究发现 CDK14 逆转了 miR-125b 的作用,过表达 CDK14 可促进 EOC 细胞的增殖和侵袭。

本研究的局限性为:① 本研究为体外实验研究,miR-125b 在 EOC 中所扮演的角色还需要未来进行体内研究。② 本实验分析了 miR-125b 和 CDK14 的靶向关系,并未对 CDK14 下游通路进行分析。③ 本研究仅分析了 miR-125b 在 EOC 中的作用,miR-125b 在其它病理分型卵巢癌中的作用还需要进一步探讨。

综上所述,miR-125b 可通过靶向 CDK14 而抑制 EOC 细胞的增殖和侵袭。miR-125b 可能成为卵巢癌治疗的潜在靶点。

【参考文献】

- [1] Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian cancer: an integrated review [J]. *Seminars in Oncology Nursing*, 2019, 35 (2): 151-156.
- [2] Dufresne S, Rebillard A, Muti P, et al. A review of physical activity and circulating mirna expression: implications in cancer risk and progression [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2018, 27 (1): 11-24.
- [3] Wang X, Kong D, Wang C, et al. Circulating microRNAs as novel potential diagnostic biomarkers for ovarian cancer: a systematic review and updated meta-analysis [J]. *J Ovarian Res*, 2019, 12 (1): 24-32.
- [4] 朱滔, 张平, 郑伟. 卵巢癌血清相关 miRNAs 的筛选及其临床意义 [J]. *中国癌症杂志*, 2016, 26(3): 201-207.
- [5] Ou-Yang J, Huang LH, Sun XX. Cyclin-dependent kinase 14 promotes cell proliferation, migration and invasion in ovarian cancer by inhibiting wnt signaling pathway [J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2017, 82(3): 230-239.
- [6] Fang F, Chang RM, Yu L, et al. MicroRNA-188-5p suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting FGF5 in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2015, 63(4): 874-885.
- [7] Chen GM, Zheng AJ, Cai J, et al. microRNA-145-3p inhibits non-small cell lung cancer cell migration and invasion by targeting PDK1 via the mTOR signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119 (1): 885-895.
- [8] He X, Maimaiti M, Jiao Y, et al. Sinomenine induces G1-phase cell cycle arrest and apoptosis in malignant glioma cells via downregulation of sirtuin 1 and induction of p53 acetylation [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2018, 17(1): 1-7.
- [9] Hua S, Quan Y, Zhan M, et al. miR-125b-5p inhibits cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma via targeting TXNRD1 [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19(1): 203-210.
- [10] Tanaka H, Hazama S. miR-125b-1 and miR-378a are predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment against colorectal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(11): 2229-2238.
- [11] Bu Q, You F, Pan G, et al. MiR-125b inhibits anaplastic thyroid cancer cell migration and invasion by targeting PIK3CD [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 88(1): 443-448.
- [12] Zhang X, Yao J, Guo K, et al. The functional mechanism of miR-125b in gastric cancer and its effect on the chemosensitivity of cisplatin [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(2): 2105-2119.
- [13] Zhu T, Gao W, Chen X, et al. A pilot study of circulating MicroRNA-125b as a diagnostic and prognostic biomarker for epithelial ovarian cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2017, 27 (1): 3-10.
- [14] 沈文静, 邱广蓉, 刘洁, 等. miR-125b 在上皮性卵巢癌组织中的表达及意义 [J]. *中国医科大学学报*, 2013, 42 (6): 518-520.
- [15] Tu J, Zhao Z, Xu M, et al. LINC00707 contributes to hepatocellular carcinoma progression via sponging miR-206 to increase CDK14 [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (7): 10615-10624.
- [16] Wang B, Zou A, Ma L, et al. miR-455 inhibits breast cancer cell proliferation through targeting CDK14 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 807(1): 138-143.
- [17] Jin B, Jin H, Wu HB, et al. Long non-coding RNA SNHG15 promotes CDK14 expression via miR-486 to accelerate non-small cell lung cancer cells progression and metastasis [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 7164-7172.
- [18] Sun Y, Wang P, Yang W, et al. The role of lncRNA MSC-AS1/miR-29b-3p axis-mediated CDK14 modulation in pancreatic cancer proliferation and gemcitabine-induced apoptosis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(6): 729-739.
- [19] Zhang W, Liu R, Tang C, et al. PFTK1 regulates cell proliferation, migration and invasion in epithelial ovarian cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 85(1): 405-416.
- [20] Li J, Shao W, Feng H. MiR-542-3p, a microRNA targeting CDK14, suppresses cell proliferation, invasiveness, and tumorigenesis of epithelial ovarian cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110(1): 850-856.

(收稿日期:2023-08-13 编辑:杨叶)