

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.17.004

miR-19 通过 Keap-Nrf2/HO-1 信号通路对卵巢癌细胞增殖的影响 *

姜红云¹ 鄢琳^{2Δ} 葛俊丽³ 姚念玲³ 康 锋⁴

(1 空军军医大学第一附属医院门诊部特需中心 陕西 西安 710000; 2 西电集团医院妇产科 陕西 西安 710077;

3 空军军医大学第一附属医院妇产科 陕西 西安 710000; 4 陕西省渭南市妇幼保健院外科 陕西 渭南 714000)

摘要 目的:研究卵巢癌组织和细胞中 miR-19 的表达,探讨其异常表达对卵巢癌细胞 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Kelch-like epichlorohydrin-associated protein1, Keap1)--核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-E2-related factor2, Nrf2)/血红素氧合酶-1(heme oxygenase1, HO-1)信号通路及卵巢癌细胞增殖的影响。**方法:**回顾性收集 2019 年 1 月至 2020 年 12 月于我院就诊的患者经病理切片诊断为卵巢癌上皮细胞的手术标本 30 例,卵巢良性肿瘤标本 30 例,正常卵巢组织标本 30 例。免疫组化检测不同标本中 Keap1、Nrf2、HO-1 的表达,检测卵巢组织及细胞中 miR-19、Keap1、Nrf2、HO-1 的 mRNA 表达水平,及卵巢癌细胞中 Keap1、Nrf2、HO-1 的蛋白表达水平。在 OVCAR-3 细胞中沉默 miR-19 后,Western Blot 检测细胞内 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达水平,收集沉默 miR-19,对照组,沉默 Nrf2、对照组的 OVCAR-3 细胞,继续培养 0 h、24 h、48 h 后,检测细胞增殖和凋亡。**结果:**Keap1 蛋白在卵巢癌组织中的阳性表达显著低于良性卵巢肿瘤组织及正常卵巢组织;Nrf2 和 HO-1 蛋白在卵巢癌组织中的阳性表达显著低于良性卵巢肿瘤组织及正常卵巢组织($P<0.05$);沉默 miR-19 抑制其表达后,细胞内 Keap1 mRNA、蛋白表达水平明显升高,Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平无明显变化,蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);沉默 miR-19 组、沉默 Nrf2 组与转染阴性对照组相比,增殖能力明显降低,凋亡能力明显升高($P<0.05$)。**结论:**卵巢癌细胞中,miR-19 表达水平升高,可通过调控 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路影响卵巢癌细胞的增殖、凋亡能力。

关键词:miR-19;Keap-Nrf2/HO-1 信号通路;卵巢癌;增殖

中图分类号:R-33;R737.31 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)17-3217-05

The Effect of miR-19 on the Proliferation of Ovarian Cancer Cells through the Keap-Nrf2/HO-1 Signaling Pathway*

JIANG Hong-yun¹, WU Lin^{2Δ}, GE Jun-Li³, YAO Nian-ling³, KANG Feng⁴

(1 Special Needs Center of Outpatient Department, First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710000, China; 2 Department of Obstetrics and Gynecology, Xidian Group Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710077, China;

3 Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710000, China; 4 Surgery, Maternal and Child Health Hospital of Weinan City, Shaanxi Province, Weinan, Shaanxi, 714000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of miR-19 in ovarian cancer tissues and cells, and to explore the effect of its abnormal expression on the Kelch like epichlorohydrin related protein-1 (Keap1)-nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway and proliferation of ovarian cancer cells. **Methods:** Retrospective collection 30 cases of ovarian cancer epithelial cells diagnosed by pathological section, 30 benign ovarian tumors, 30 normal ovarian tissue specimens From January 2019 to December 2020. The expression of Keap1, Nrf2, HO-1 in different specimens was detected by Immunohistochemical, the mRNA expression of miR-19, Keap1, Nrf2, HO-1 in ovarian tissue and cells was detected, the protein expression of Keap1, Nrf2, HO-1 in ovarian tissue and cells was detected. The protein expression of Keap1, Nrf2, HO-1 in OVCAR-3 cells of miR-19 (-). Collect OVCAR-3 cells of miR-19 silence group, Control group, Nrf2-silence group, control group after incubating 0 h, 24 h, 48 h, MTT detects cell proliferation and apoptosis. **Results:** The positive expression of Keap1 protein in ovarian cancer tissue was significantly lower than that in benign ovarian tumor tissue and normal ovarian tissue, and the positive expression of Nrf2 and HO-1 protein in ovarian cancer tissue was significantly lower than that in benign ovarian tumor tissue and normal ovarian tissue ($P<0.05$). The expression level of Keap1 mRNA, protein in cells increased significantly after silencing miR-19, Nrf2, HO-1 mRNA expression level did not change significantly, and protein expression level decreased significantly($P<0.05$). Compared with transfection negative control group, the proliferation ability and apoptosis ability of silencing miR-19 group and silencing Nrf2 group decreased significantly($P<0.05$). **Conclusion:** miR-19 expression level in ovarian cancer cells is elevated, which can affect the value-added and apoptosis ability of ovarian cancer cells by regulating Keap1-Nrf2/HO-1 signaling pathway.

* 基金项目:陕西省卫生健康委科研基金项目(2018C007)

作者简介:姜红云(1976-),女,本科,主治医师,研究方向:妇产科,电话:15319428551,E-mail:jiang153194@163.com

Δ 通讯作者:鄢琳(1978-),女,硕士,副主任医师,研究方向:科肿瘤和高危产科方向,电话:13201535515,E-mail:wulin65420361@126.com

(收稿日期:2021-02-05 接受日期:2021-02-28)

Key words: miR-19; Keap1-Nrf2/HO-1 signaling pathway; Ovarian cancer; Proliferation

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)17-3217-05

前言

卵巢癌是当今世界女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率较高,常见于围绝经期妇女,近年发病趋势趋于年轻化^[1]。卵巢癌起病隐匿,早期无明显症状,一经发现大多处于中晚期,出现腹胀、腹部包块等肿瘤浸润症状,预后不良^[2]。随着治疗技术的更新,其5年生存率仍较低,故探究卵巢癌发病的分子机制,寻找新的治疗靶点显得尤为重要^[3]。卵巢癌的病因十分复杂,可能与持续排卵或高促性腺激素等有关,是遗传、环境、激素、心理等多因素共同作用的结果,其中遗传可能是卵巢癌发生的独立危险因素^[4]。非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)是广泛存在于人体内,不翻译成蛋白质的,但具有重要作用的一类RNA,可大致分为长链、短链^[5]。而miRNA(microRNA, miRNA)是短链中最常见的一种,位于真核细胞内。miRNA在生物进化过程中高度保守,虽不编码蛋白质,但可通过碱基互补配对的方式,与靶基因3'UTR区(3'untranslated region, 3'UTR)发生特异性结合,引起靶基因的降解,参与基因的转录后调控^[6]。miRNA与靶基因的调控不是一一对应的,即一种miRNA可调节多个靶基因,而一个靶基因也可受多种miRNA的调控^[7]。miRNA在细胞增殖、迁移、侵袭、胚胎发育等过程中发挥重要作用^[8]。miRNA可能通过激活机体的原癌基因或抑癌基因,发挥促癌或抑癌的作用。既往研究发现miR-19在宫颈癌^[9]、胃癌^[10]、骨肉瘤^[11]中低表达,发挥抑癌作用,在前列腺癌^[12]中高表达,发挥促癌作用,但在卵巢癌中的作用尚未见报道。已有研究发现氧化应激参与肿瘤的发生发展,而Keap1-Nrf/HO-1通路是氧化应激的关键通路。本研究就miR-19对Keap1-Nrf/HO-1通路及卵巢癌中的作用进行以下研究。

1 材料与方法

1.1 研究材料

卵巢癌OVCAR-3细胞株;兔抗人Nrf2多克隆抗体、兔抗人Keap1多克隆抗体、兔抗人血红素氧合酶-1(heme oxygenase1, HO-1)抗体(Santa Cruz);1640培养基(美国Hyclone),新生牛血清(美国Gibco有限公司),0.25%胰蛋白酶(美国Sigma公司),ECL发光液(美国Amersham公司)。

1.2 标本

收集2019年1月至2020年12月于我院行手术的卵巢上皮癌患者手术标本30例(术前未经放化疗治疗,给予肿瘤细胞减灭术,病理证实为卵巢上皮癌者),收集同期确诊为卵巢良性肿瘤手术标本30例(同期医院就诊,病理证实为良性组织)。卵巢癌患者年龄为26-74岁。FIGO(2000)分期:I-II期16例,III-IV期14例,病理分型:浆液性腺癌18例,粘液性腺癌8例,透明细胞癌4例。

1.3 免疫组化

所有组织经10%甲醛固定后,石蜡包埋制成蜡块,切成薄片,进行免疫组化实验。柠檬酸水溶液预处理,高压抗原修

复。实验以PBS作为阴性对照,用实验室前期同组织制作病并存档的已知Nrf2阳性、Keap1阳性、HO-1阳性的浆液性子宫内膜癌切片作为阳性对照。

1.4 细胞培养

将乳腺癌细胞培养至80%~90%融合度时,转染miRNA或Nrf2。待细胞长满后,采用常温PBS冲洗,细胞刮刀收集细胞,置于离心机中,离心后取上清至1.5 mL离心管中,负20摄氏度保存,用于后续实验。

1.5 qRT-PCR检测卵巢癌组织和细胞中miR-19以及Keap1--Nrf2/HO-1信号通路表达

取癌组织及癌旁组织研磨后,TRIzol提取总mRNA和总miRNA;RNA经1%琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度法D260/D280比值,反转录试剂盒进行miRNA反转录,操作参照试剂盒说明书。在OVCAR-3细胞中分别转染mi-19沉默质粒及阴性对照物,Nrf2沉默质粒及阴性对照物后,检测Keap1--Nrf2/HO-1信号通路RNA的表达情况。

1.6 Western Blot检测Keap1--Nrf2/HO-1信号通路的表达

在OVCAR-3细胞中分别转染miR-19、Nrf2沉默质粒及其阴性对照物,检测细胞内Keap1--Nrf2/HO-1信号蛋白表达水平。

1.7 MTT检测OVCAR-3细胞增殖

消化细胞,制成单细胞悬液,接种于96孔板,CO₂培养箱中培养0 h、24 h、48 h,加入20 mL MTT,继续培养5 h,弃培养液,加入150 mL DMSO,摇床孵育30 min,酶标仪测定OD值,计算细胞生长抑制率(IR)。

1.8 AnnexinV/PI法检测不同处理组细胞凋亡

取对数生长期的SKV03细胞,5×10⁵/L的单细胞悬液接种于6孔培养板中,分别转染miR-19、Nrf2沉默质粒及其阴性对照物,每个时间点设5个复孔,继续培养24 h、48 h后,0.25%胰酶消化细胞,1000 rpm离心10 min,弃上清。将细胞重悬于100 mL结合缓冲液中,加入5 mL膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素和10 mL碘化丙啶,混匀,避光室温反应15 min后,加入400 mL结合缓冲液1 h内上机检测。

1.9 统计学处理

采用SPSS21.0,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析,两两比较用t检验;计数资料(%)表示,用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 Keap1--Nrf2/HO-1在卵巢癌、卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织的表达

Keap1在卵巢癌组织中阳性率明显低于卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织($\chi^2=5.824, 7.208, P < 0.05$)。Nrf2在卵巢癌组织中的阳性率明显高于卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织($\chi^2=10.261, 7.185, P < 0.05$)。HO-1在正常卵巢组织、卵巢癌组织中的阳性率明显高于卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织($\chi^2=14.625, 9.517, P < 0.05$),见表1。

表 1 三组标本组织中 Keap1--Nrf2/HO-1 的阳性率比较

Table 1 Comparison of the positive rate of Keap1--Nrf2/HO-1 in the three groups of specimens

Groups	Ovarian cancer (n=30)	Ovarian benign tumor (n=30)	Normal ovarian tissue (n=30)
Keap1	4(13.33)*#	17(56.67)	5(16.67)
Nrf2	18(53.33)*#	7(23.33)	3(10.00)
HO-1	23(76.67)*#	5(16.67)	0

Note: *Compared with normal ovarian tissue, $P<0.05$; #Compared with ovarian benign tumor, $P<0.05$.

2.2 卵巢癌组织中 miR-19 以及 Keap1--Nrf2/HO-1 的表达

采用 qRT-PCR 检测卵巢癌、卵巢良性肿瘤、正常卵巢组织中 miR-19、Keap1、Nrf2、HO-1 的表达水平,结果发现:卵巢癌中 miR-19 的表达水平较卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织明显升高($t=17.229, 19.317, P<0.05$);卵巢癌中 Keap1 mRNA 表达水

平较卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织明显降低($t=14.816, 14.175, P<0.05$);卵巢癌中 Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平较卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织明显升高($t=8.516, 12.273, P<0.05$),见表 2。

表 2 三组 miR-19 以及 Keap1--Nrf2/HO-1 的表达比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 The expression comparison of three groups of miR-19 and Keap1--Nrf2/HO-1($\bar{x} \pm s$)

Groups	Ovarian cancer (n=30)	Ovarian benign tumor (n=30)	Normal ovarian tissue (n=30)
miR-19	11.628 $\pm$ 2.115*#	2.816 $\pm$ 0.127	2.317 $\pm$ 0.168
Keap1 mRNA	1.318 $\pm$ 0.013*#	5.267 $\pm$ 1.208	6.175 $\pm$ 1.334
Nrf2 mRNA	9.862 $\pm$ 0.217*#	3.289 $\pm$ 0.162	2.885 $\pm$ 0.177
HO-1 mRNA	7.592 $\pm$ 0.337*#	2.859 $\pm$ 0.227	2.759 $\pm$ 0.294

Note: *Compared with normal ovarian tissue, $P<0.05$; #Compared with ovarian benign tumor, $P<0.05$.

2.3 卵巢癌细胞中 miR-19 以及 Keap1--Nrf2/HO-1 的表达影响

miR-19 (-) 组 Keap1 mRNA 表达水平较对照组明显升高($P<0.05$),miR-19、Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平较对照组明显

降低($P<0.05$);miR-19(-)组 Keap1 蛋白表达水平较对照组明显增强($P<0.05$),Nrf2、HO-1 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。见表 3、表 4。

表 3 卵巢癌细胞中 miR-19 对 Keap1--Nrf2/HO-1 表达的影响($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of miR-19 on Keap1--Nrf2/HO-1 expression in ovarian cancer cells($\bar{x} \pm s$)

Groups	Control group	miR-19(-)	t	P
miR-19	10.879 $\pm$ 1.261	2.135 $\pm$ 0.226	11.268	0.034
Keap1 mRNA	1.315 $\pm$ 0.143	5.846 $\pm$ 0.122	14.219	0.029
Nrf2 mRNA	8.126 $\pm$ 0.338	3.018 $\pm$ 0.154	51.267	0.008
HO-1 mRNA	7.986 $\pm$ 0.162	2.167 $\pm$ 0.177	9.257	0.039

表 4 卵巢癌细胞中 miR-19 对 Keap1--Nrf2/HO-1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)Table 4 Effect of miR-19 on Keap1--Nrf2/HO-1 protein expression in ovarian cancer cells($\bar{x} \pm s$)

Groups	Control group	miR-19(-)	t	P
Keap1 protein	1.014 $\pm$ 0.022	3.018 $\pm$ 0.025	20.14	0.014
Nrf2 protein	4.017 $\pm$ 0.114	1.124 $\pm$ 0.007	8.126	0.042
HO-1 protein	6.204 $\pm$ 0.219	1.985 $\pm$ 0.019	9.127	0.041

2.4 细胞增殖能力比较

miR-19(-)组、Nrf2(-)组 0 h、24 h 细胞增殖能力较对照组无明显变化($P>0.05$);miR-19(-)组、Nrf2(-)组 48 h 细胞增殖能力较对照组明显降低($P<0.05$),见表 5。

2.5 细胞凋亡能力比较

miR-19(-)组、Nrf2(-)组 24 h 细胞凋亡能力较对照组无明

显变化($P>0.05$);miR-19(-)组、Nrf2(-)组 48 h 细胞增殖能力较对照组明显降低($P<0.05$),见表 6。

3 讨论

卵巢癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,发病率逐年升高,严重威胁女性健康。可发生于任何年龄,年轻女性易患生殖

表 5 不同处理组培养 0 h、24 h、48 h 后卵巢癌细胞增殖能力比较(%, $\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of cell proliferation ability of ovarian cancer cells after 0 h, 24 h, and 48 h in different treatment groups (%, $\bar{x} \pm s$)

Groups	n	0 h	24 h	48 h
miR-19(-)-NC	10	1.286 $\pm$ 0.021	3.215 $\pm$ 0.127	5.134 $\pm$ 1.003
miR-19(-)	10	1.326 $\pm$ 0.015	1.958 $\pm$ 0.725	2.151 $\pm$ 0.026
t		0.137	2.315	7.426
P		0.815	0.23	0.045
Nrf2(-)-NC	10	1.552 $\pm$ 0.023	3.125 $\pm$ 1.257	5.261 $\pm$ 1.154
Nrf2(-)	10	1.782 $\pm$ 0.004	1.825 $\pm$ 0.117	2.167 $\pm$ 0.018
t		0.255	2.346	7.521
P		0.721	0.21	0.044

表 6 不同处理组培养 24 h、48 h 后细胞凋亡能力比较($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparison of apoptosis ability in different treatment groups after 24 h and 48 h culture ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	24 h	48 h
miR-19(-)-NC	10	3.42 $\pm$ 0.77	4.26 $\pm$ 1.21
miR-19(-)	10	3.31 $\pm$ 1.28	11.29 $\pm$ 2.34
t		0.148	7.261
P		0.792	0.042
Nrf2(-)-NC	10	2.84 $\pm$ 0.79	3.20 $\pm$ 1.17
Nrf2(-)	10	2.75 $\pm$ 0.82	7.82 $\pm$ 2.16
t		0.124	13.158
P		0.863	0.031

胞肿瘤,而中老年女性易患上皮性卵巢癌^[13]。卵巢较小,位置较深,一经发现大多处于中晚期。早期缺乏特异症状,卵巢癌最常见的类型是上皮性卵巢癌,恶性程度高,死亡率高,易复发,5年生存率低^[14]。卵巢癌细胞是卵巢癌发生、生长、转移的基础,可在一定程度上提示病情的严重程度^[15]。miRNA 具有广泛的基因调节功能,在卵巢癌的发生、发展过程中发挥作用^[16]。Nrf2 是 CNC 转录因子成员之一,具有碱性亮氨酸拉链结构,是氧化应激反应的重要调节因子之一^[17]。Keap1 是 Kelch 家族的成员之一,是 Nrf2 的调节因子,可对 Nrf2 进行负性调控^[18]。正常情况下,Keap1-Cu13-E3 泛素连接复合体与 Nrf2 结合,使得 Nrf2 被泛素化,进而降解失去功能^[19],当机体发生氧化应激反应时,Nrf2 经过特定的修饰作用与 Keap1 解离,转移到细胞核内,调控细胞内的转录活动^[20]。HO-1 是 Nrf2 的靶基因之一,可作为一种保护性因素,抵御外界各种刺激和伤害,恢复内环境稳态^[21]。

本研究发现 Keap1 在卵巢癌组织中阳性率明显低于卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织。Nrf2、HO-1 在卵巢癌组织中的阳性率明显高于卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织。卵巢癌中 miR-19 的表达水平较卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织明显升高;卵巢癌中 Keap1 mRNA、蛋白表达水平较卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织明显降低;卵巢癌中 Nrf2、HO-1 mRNA、蛋白表达水平较卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织明显升高,与免疫组化结果一致。提示卵巢癌中 Keap-Nrf2/HO-1 通路被激活,Keap1 表达减少,导致 Keap1 与 Nrf2 发生解离,激素在细胞核中,Nrf2、HO-1 表

达升高,与李亚玲^[22]研究结果相一致,该学者探讨 Nrf2 及 P62 在卵巢癌及相应的正常组织中的阳性表达情况,收集 70 例卵巢癌组织及正常组织,结果显示在卵巢癌组织中,Nrf2 与 P62 蛋白及 mRNA 的表达量均明显高于正常组织。

miR-19(-)组 Keap1 mRNA、蛋白表达水平较对照组明显升高,Nrf2、HO-1 mRNA、蛋白表达水平较对照组明显降低。近来研究发现 miRNA 可以进入肿瘤患者的血液循环,对于肿瘤的早期诊断、早期干预具有重要作用。本研究提示 miR-19 可靶向抑制 Keap1 的表达,进而影响 Keap1--Nrf2/HO-1 通路的表达。在卵巢癌组织和细胞中 miR-19 高表达,Keap1 低表达,沉默 miR-19 后,Keap1 表达明显升高,Nrf2、HO-1 表达明显降低,与田文秀^[23]等学者的研究类似,观察卵巢癌组织和细胞中 miR-141 的表达,探讨其异常表达对卵巢癌细胞 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路的影响,选择卵巢上皮癌患者的手术标本 15 例,良性卵巢肿瘤标本 15 例及正常卵巢组织标本 15 例,经检测后,Keap1 蛋白在卵巢癌组织中的阳性表达显著低于良性卵巢肿瘤组织及正常卵巢组织,Nrf2 和 HO-1 蛋白在卵巢癌组织中的阳性表达显著低于良性卵巢肿瘤组织及正常卵巢组织,转染 miR-141siRNA 抑制其表达后,与转染阴性对照物组相比,细胞内 Keap1 mRNA 水平和蛋白表达显著上升,Nrf2、HO-1 mRNA 水平表达变化无显著差异,而蛋白表达水平降低。本研究结果提示 miR-19 的表达异常可能引起 Keap1 与 Nrf2 解偶联异常,进而调节卵巢癌的发生。在乳腺癌细胞中,

Keap-Nrf2/HO-1 通路的表达异常与 miR-200 密切先关, miR-200 可通过与 Keap1 相互作用,促进其降解,导致 Nrf2 在细胞核内聚集,影响乳腺癌的进展^[24]。此外在低氧条件下, miR-101 可作用于 Cul13,促进其降解,诱导 Nrf2 及 HO-1 蛋白的表达,提示 miRNA 可能通过与 Nrf2 相互作用,影响其通路的作用^[25]。在神经母细胞瘤中,miRNA 可能通过降低 Nrf2 的细胞核内表达,降低 NQO1 等蛋白的表达,影响肿瘤的发生^[26]。Keap1--Nrf2/HO-1 信号通路与体内多种生理反应密切相关,对机体抗炎、抗肿瘤、调节免疫具有重要调控作用^[27],而该通路也可能受 miR-19 的影响,为 miR-19 对卵巢癌的作用价值提供参考价值。

为进一步研究 miR-19 对卵巢癌细胞增殖、凋亡能力的影响,本研究沉默 miR-19 后,发现 miR-19(-)组、Nrf2(-)组 0 h、24 h 细胞增殖能力较对照组无明显变化,48 h 细胞增殖能力较对照组明显降低;miR-19(-)组、Nrf2(-)组 24 h 细胞凋亡能力较对照组无明显变化,48 h 细胞增殖能力较对照组明显降低。目前关于 miR 其他成员,如 miR-599^[28]、miR-141^[23]、miR-125^[29] 对卵巢癌细胞增殖、凋亡的研究比较多,但是关于 miR-19 还没有类似的研究。本研究创新的研究了 miR-19 对卵巢癌细胞增殖、凋亡能力的影响,提示 miR-19 可能对卵巢癌的增殖和凋亡能力具有一定作用^[30],可能通过调节 Keap-Nrf2/HO-1 影响细胞的增殖、凋亡。

当然,本研究存在一定局限性。① 本研究样本量较小;② 未对 miR-19 对 Keap-Nrf2/HO-1 作用点机制进行具体研究;③ 未对卵巢癌的病情严重程度进行进一步分类。未来期待临床多中心、大样本、临床与基础相结合的研究,为卵巢癌的靶向治疗带来新的参考依据。

综上,卵巢癌细胞中,miR-19 表达水平升高,可通过调控 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路影响卵巢癌细胞的增殖、凋亡能力。

参考文献(References)

- [1] Saleh M, Bhosale P, Menias CO, et al. Ovarian teratomas: clinical features, imaging findings and management [J]. Abdom Radiol (NY), 2021, 46: e1007
- [2] Liu YK, Jia YJ, Liu SH, et al. FSTL1 increases cisplatin sensitivity in epithelial ovarian cancer cells by inhibition of NF- κ B pathway [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2021[Online ahead of print]
- [3] Takahashi Y, Serada S, Ohkawara T, et al. LSR promotes epithelial ovarian cancer cell survival under energy stress through the LKB1-AMPK pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 537: 93-99
- [4] Li M, Chi C, Zhou L, et al. Circular PVT1 regulates cell proliferation and invasion via miR-149-5p/FOXO1 axis in ovarian cancer [J]. J Cancer, 2021, 12(2): 611-621
- [5] Razavi ZS, Tajiknia V, Majidi S, et al. Gynecologic cancers and non-coding RNAs: Epigenetic regulators with emerging roles[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2020, 157: e103192
- [6] Huang Z, Xu Y, Wan M, et al. miR-340: A multifunctional role in human malignant diseases[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(1): 236-246
- [7] Tan H, Wu C, Huang B, et al. MiR-3666 serves as a tumor suppressor in ovarian carcinoma by down-regulating AK4 via targeting STAT3 [J]. Cancer Biomark, 2020[Online ahead of print]
- [8] Kushlinskii NE, Loginov VI, Utkin DO, et al. Novel miRNAs as Potential Regulators of PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint, and Prognostic Value of MIR9-1 and MIR124-2 Methylation in Ovarian Cancer [J]. Mol Biol (Mosk), 2020, 54(6): 990-996
- [9] 段德敏, 柴明涵. 老年宫颈癌组织中 miR-424、miR-19a、miR-95 的表达及与放疗敏感性的相关性分析[J]. 国际医药卫生导报, 2020, 26(17): 2548-2552
- [10] 翁国武, 周真真. miR-19a 通过 Fas 基因调节胃癌细胞增殖水平的实验研究[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(2): 158-163+169
- [11] 罗小端, 钟继涛, 宋泽, 等. MiR-19a 在骨肉瘤预后中的临床意义[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2020, 34(1): 20-22+93
- [12] 叶明信, 戴涛, 谢宇. miR-19a-3p 在前列腺癌细胞侵袭和迁移中的作用[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(2): 822-829
- [13] Wang J, Hsu SW, Gonzalez-Pech N, et al. Copper Sulfide Nanodisks and Nanoprisms for Photoacoustic Ovarian Tumor Imaging [J]. Part Part Syst Charact, 2019, 36(8): e1900171
- [14] Shylasree TS, Kattapur AK, Gupta M, et al. Compliance to treatment guidelines and survival in women undergoing interval debulking surgery for advanced epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Rep (Hoboken), 2020, 3(2): e1217
- [15] Zuhdy M, Alghandour R, Abdelazeem G, et al. Axillary nodal metastasis in ovarian cancer: a report of three cases and review of literature [J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2019, 31(1): e9
- [16] Satapathy S, Kumar C, Singh RK. MicroRNAs as Key Regulators of Ovarian Cancers[J]. Cell Med, 2019, 11: e2155179019873849
- [17] Li D, Bai X, Jiang Y, et al. Butyrate alleviates PTZ-induced mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neuron apoptosis in mice via Keap1/Nrf2/HO-1 pathway[J]. Brain Res Bull, 2020, 168: 25-35
- [18] Younis NS, Abduldaum MS, Mohamed ME. Protective Effect of Geraniol on Oxidative, Inflammatory and Apoptotic Alterations in Isoproterenol-Induced Cardiotoxicity: Role of the Keap1/Nrf2/HO-1 and PI3K/Akt/mTOR Pathways[J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(10): e977
- [19] Zhang C, Kong X, Ma D. miR-141-3p inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration via regulating Keap1/Nrf2/HO-1 pathway[J]. IUBMB Life, 2020, 72(10): 2167-2179
- [20] Shi Y, Tian C, Yu X, et al. Protective Effects of Smilax glabra Roxb. Against Lead-Induced Renal Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Weaning Rats and HEK-293 Cells [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: e556248
- [21] Liang Y, Zheng B, Li J, et al. Crocin ameliorates arsenic trioxide induced cardiotoxicity via Keap1-Nrf2/HO-1 pathway: Reducing oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: e110713
- [22] 李亚玲, 王丰艳, 李欢, 等. Nrf2 及 P62 在卵巢癌组织中的表达及临床意义[J]. 陕西医学杂志, 2017, 46(10): 1351-1352, 1385
- [23] 田文秀, 王晶, 徐丹, 等. miR-141 靶向调控 Keap-Nrf2/HO-1 信号通路对卵巢癌发生发展的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 315(11): 67-72
- [24] Eades G, Yang MH, Yao Y, et al. miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells [J]. J Biol Chem, 2011, 286(47): 40725-40733

- [13] Ding J, Tan X, Song K, et al. Effect of Controlled Ovarian Hyperstimulation on Puberty and Estrus in Mice Offspring [J]. *Reproduction*, 2017, 154(4): 433-444
- [14] Simón C, Cano F, Valbuena D, et al. Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients[J]. *Hum Reprod*, 1995, 10(9): 2432-2437
- [15] Craciunas L, Gallos I, Chu J, et al. Conventional and modern markers of endometrial receptivity: a systematic review and meta-analysis[J]. *Hum Reprod Update*, 2019, 25(2): 202-223
- [16] 刘换霞, 陈梅, 谭福红. 中医补肾法在改善子宫内膜容受性中的研究概况[J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34(01): 233-237
- [17] 耿丹丹, 杜惠兰, 魏学聪, 等. 补肾助孕方, 逍遥丸对超促排卵小鼠围产期妊娠结局和子宫内膜容受性的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(9): 72-79
- [18] 周薇. 寿胎丸治疗体外授精-胚胎移植肾虚证的临床疗效评价及作用机制研究[D]湖南中医药大学, 2017
- [19] Li Nan, Wang Lijun, Zhang Hui. Effect of Shoutaiwan in clomiphene ovulation induction cycle on the endometrium and its receptivity during the implantation window of mice and pregnancy outcome [J]. *Guangxi Medicine*, 2019, 41(11): 55-59+63
- [20] Gnainsky Y, Granot I, Aldo P, et al. Biopsy-induced inflammatory conditions improve endometrial receptivity: the mechanism of action [J]. *Reproduction*, 2015, 149(1): 75-85
- [21] Mansouri-Attia N, Oliveira LJ, Forde N, et al. Pivotal role for monocytes/macrophages and dendritic cells in maternal immune response to the developing embryo in cattle[J]. *Biol Reprod*, 2012, 87(5): e123
- [22] Xu Shiru, Liu Su, Li Yuye, et al. Analysis of the number of endometrial dendritic cells in secretory period in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. *Chinese Journal of Reproduction and Contraception*, 2018, 2: 89-95
- [23] Eskandarian M, Moazzeni SM. Uterine Dendritic Cells Modulation by Mesenchymal Stem Cells Provides A Protective Microenvironment at The Feto-Maternal Interface: Improved Pregnancy Outcome in Abortion-Prone Mice [J]. *Cell Journal (Yakhteh)*, 2019, 21 (3): 274-280
- [24] Zhou Yijun, Gao Juan, Yang Huamei, et al. Study on the morphology of intestinal mucosa and the development and activation of dendritic cells in rats at different developmental stages[J]. *The Journal of Clinical Pediatrics*, 2008, 26(8): 708-711
- [25] 陈丽, 张娟, 郑翠红, 等. 不同剂量寿胎丸对促排卵大鼠胚胎着床的影响及机制[J]. *华南国防医学杂志*, 2017, 31(1): 1-4
- [26] Lee JH, Parveen A, Do MH, et al. Molecular mechanisms of methylglyoxal-induced aortic endothelial dysfunction in human vascular endothelial cells[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11(5): e1038
- [27] Meduri G, Bausero P, Applanat M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the human endometrium: modulation during menstrual cycle[J]. *Biology Reprod*, 2000, 62(2): 439-447
- [28] Takashi I, Ueda Y, Wrsdrfer P, et al. Resident CD34-positive cells contribute to peri-endothelial cells and vascular morphogenesis in salivary gland after irradiation [J]. *Journal of Neural Transmission*, 2020
- [29] Dong HX, Zhong ZY, Chen W, et al. Effect of Acupuncture on Endometrial Angiogenesis and Uterus Dendritic Cells in COH Rats during Peri-Implantation Period [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: e3647080
- [30] Wang Jianing, Zhou Ying, Xia Fei. Research progress on endometrial angiogenesis during embryo periimplantation [J]. *Chinese Journal of Reproduction and Contraception*, 2017, 37(3): 240-244
- [31] Selman MO, Al-Hassani WR, Al-Wasiti E, et al. Role of IGF 1, VEGF, Vit. D3 and Vit. B12 in high AMH level in Iraqi Infertile women as criteria to prepare them for IVF[J]. *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2019, 7(7): 237-240
- [32] Wang L, Lv S, Mao W, et al. Assessment of endometrial receptivity during implantation window in women with unexplained infertility[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2020, 36(10): 917-921

(上接第 3221 页)

- [25] Singh B, Ronghe AM, Chatterjee A, et al. MicroRNA-93 regulates NRF2 expression and is associated with breast carcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(5): 1165-1172
- [26] Narasimhan M, Patel D, Vedpathak D, et al. Identification of novel microRNAs in post-transcriptional control of Nrf2 expression and redox homeostasis in neuronal, SHSY5Y cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (12): e51111
- [27] Chen L, Li K, Liu Q, et al. Protective effects of raspberry on the oxidative damage in HepG2 cells through Keap1/Nrf2-dependent signaling pathway[J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 133: e110781
- [28] 魏峰, 张锦, 张逸群, 等. miR-599 表达变化对卵巢癌细胞增殖侵袭能力的影响[J]. *中国医师杂志*, 2020, 22(8): 1220-1224
- [29] 何晶晶, 朱凯. miR-125a-5p 对卵巢癌细胞的增殖迁移和侵袭能力的影响[J]. *安徽医学*, 2019, 40(9): 961-965
- [30] Yang S, Yang R, Lin R, et al. MicroRNA-375 inhibits the growth, drug sensitivity and metastasis of human ovarian cancer cells by targeting PAX2[J]. *J BUON*, 2019, 24(6): 2341-2346