

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.05.008

miR-93-5p 通过靶向 CDKN1A 促进多囊卵巢综合征颗粒样瘤细胞 KGN 的生长增殖 *

樊 丽 许常娟 申茹萌 宁艳辉 杨 丽

(南部战区总医院 157 分院妇产科 广东 广州 510080)

摘要 目的:验证 CDKN1A 是 miR-93-5p 直接调控的靶基因,阐明 miR-93-5p 可通过靶向 CDKN1A 促进人卵巢颗粒样肿瘤细胞系 KGN 的生长增殖。**方法:**选取我院 2016 年 6 月-2019 年 6 月期间确诊的 40 例多囊卵巢综合征(PCOS)患者作为研究对象,qRT-PCR 检测 PCOS 病变卵巢组织和病灶旁正常卵巢组织(对照)中 miR-93-5p 和 CDKN1A 的表达水平。TargetScan 软件用以预测 miR-93-5p 靶基因,并使 CDKN1A 所含 3'-UTR 克隆至目的基因下游(CDKN1A-wt 或 CDKN1A-mut),并分别与 miR-93-5p 模拟物(miR-93-5p mimics)以及其无关对照寡核苷酸序列(scramble)共转染,荧光素酶报告基因实验验证所预测的靶基因,qRT-PCR 和 Western blot 分别检测转染 miR-93-5p mimics 及其对照 scramble-1、miR-93-5p 抑制剂(miR-93-5p inhibitor)及其对照 scramble-2 后的 mRNA 和蛋白表达水平。MTT 实验验证分别转染 miR-93-5p mimics、scramble、CDKN1A 质粒(pcDNA3.1-CDKN1A)、空载体 vector (pcDNA3.1)、miR-93-5p+CDKN1A 质粒、scramble+vector 质粒到 KGN 细胞中后细胞的生长增殖活性。**结果:**miR-93-5p 在 PCOS 病变卵巢组织中的表达水平显著高于正常卵巢组织,CDKN1A 在 PCOS 患者卵巢组织中的表达水平显著低于正常卵巢组织(均 $P<0.05$)。在共转染 miR-93-5p mimics 和 CDKN1A-wt、scramble 和 CDKN1A-wt 的两组中,与共转染 scramble 和 CDKN1A-wt 组相比,共转染 miR-93-5p 和 CDKN1A-wt 组的荧光素酶活性强度降低了约 40.9% ($P<0.05$)。转染 miR-93-5p mimics 后,CDKN1A 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著下调($P<0.05$);转染 miR-93-5p inhibitor 后,CDKN1A 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著上调($P<0.05$)。在细胞增殖实验中,转染 miR-93-5p mimics 后,KGN 细胞的生长速度显著高于 scramble 组($P<0.05$);与 vector 组比,转染 CDKN1A 可显著抑制 KGN 细胞的生长($P<0.05$);同时转染 miR-93-5p mimics 和 CDKN1A 后,miR-93-5p 对细胞增殖的促进作用降低($P<0.05$)。**结论:**miR-93-5p 通过靶向调控 CDKN1A 表达而促进人卵巢颗粒样肿瘤细胞系 KGN 的生长增殖。

关键词:多囊卵巢综合征;miRNA-93-5p;CDKN1A;增殖

中图分类号:R-33;R711.75 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)05-840-06

miR-93-5p Promotes the Growth and Proliferation of KGN in Granulomatous Tumor Cells of Polycystic Ovary Syndrome by Targeting CDKN1A*

FAN Li, XU Chang-juan, SHEN Ru-meng, NING Yan-hui, YANG Li

(Department of Obstetrics and Gynecology, 157 Branch of Southern Theater General Hospital, Guangzhou, Guangdong, 510080, China)

ABSTRACT Objective: To verify that CDKN1A is a target gene directly regulated by miR-93-5p, and to clarify that miR-93-5p can promote the growth and proliferation of human ovarian granulosa tumor cell line kgn by targeting CDKN1A. **Methods:** 40 patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) diagnosed by our hospital from June 2016 to June 2019 were selected as the research objects, qRT-PCR was used to detect the expression of miR-93-5p and CDKN1A in diseased and normal ovarian tissues (control). the target gene of miR-93-5p was predicted by Targetscan software, and the 3'-UTR contained in CDKN1A was cloned to the downstream of the target gene (CDKN1A-wt or CDKN1A-mut), and co transfected with miR-93-5p mimic (miR-93-5p mimics) and its unrelated control oligonucleotide sequence (scramble) respectively. Luciferase reporter gene experiment verifies the predicted target gene, were verified by the fluorescent enzyme reporter gene experiment. The expression level of mRNA and protein of the target gene was detected by qRT PCR and Western blot methods. MTT assay was used to verify the growth and proliferation of kgn cells transfected with miR-93-5p mimics, scramble, CDKN1A plasmid (pcDNA3.1-CDKN1A), vector (pcDNA3.1), miR-93-5p + CDKN1A and scramble + vector plasmids. **Results:** The expression level of miR-93-5p in diseased ovarian tissue was significantly higher than that of normal ovarian tissue, and the expression level of CDKN1A in ovarian tissue of PCOS patients was significantly lower than that of normal ovarian tissue (all $P<0.05$). In the co transfection of miR-93-5p mimics and CDKN1A-wt, scramble and CDKN1A-wt, compared with the co transfection of scramble and CDKN1A-wt, the activity of luciferase in the co transfection of miR-93-5p and CDKN1A-wt decreased by 40.9% ($P<0.05$). After transfected by miR-93-5p mimics, the mRNA and protein expression of CDKN1A were significantly down

* 基金项目:军队后勤科研项目(CWH16C0417)

作者简介:樊丽(1984-),女,本科,住院医师,研究方向:多囊卵巢综合征,E-mail:fanli157@126.com

(收稿日期:2020-06-27 接受日期:2020-07-23)

regulated ($P<0.05$); after transfected by miR-93-5p inhibitor, the mRNA and protein expression of CDKN1A were significantly up regulated ($P<0.05$). In the experiment of cell proliferation, the growth rate of KGN cells was significantly higher than that of scramble group ($P<0.05$) after transfected by miR-93-5p mimics; compared with vector group, CDKN1A could significantly inhibit the growth of KGN cells ($P<0.05$); After simultaneous transfected by miR-93-5p mimics and CDKN1A, the promoting effect of miR-93-5p on cell proliferation was decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** miR-93-5p can promote the growth and proliferation of KGN by targeting CDKN1A expression.

Key words: Polycystic ovary syndrome; miRNA-93-5p; CDKN1A; Proliferation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R711.75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)05-840-06

前言

多囊卵巢综合征(Polycystic ovary syndrome, PCOS)属于一种女性生殖系统相关内分泌病症,通常在育龄期女性中较为多见^[1,2]。75%左右的PCOS患者存在胰岛素抵抗,雄激素浓度过高,过胖,闭经等^[3]。微小MicroRNAs(miRNAs)属于内源型非编码形成的一类小分子RNA,能和mRNA自身3'-UTR形成(不)完全配对,进而导致mRNA降解,并阻碍mRNA翻译,从而负向调节其转录后的水平^[4]。目前,miRNAs已被证实和细胞增殖及分化,以及侵袭和转移等过程有关^[5,6]。且研究发现miRNAs可参与多种疾病的发生亦或是癌症的进展,甚至和个体发育等过程也联系紧密^[7,8]。有报道显示PCOS与多种miRNAs的异常表达有着密切关联,也与多项临床指标呈正相关或负相关,例如PCOS与miR-93,miR-509,miR-223等miR的表达相关,与胰岛素和雄激素等相关^[9,10]。miR-93具有茎环结构前体,根据miR-93在细胞核外的剪接位点的不同分为miR-93-3p和miR-93-5p^[11,12]。目前对miR-93研究较为深入,但对miR-93-5p的研究极少^[13,14]。尽管已有研究表明miR-93的表达与PCOS相关,且miR-93在肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移、分化等方面发挥了十分重要的作用,但是关于miR-93-5p与PCOS相关性的研究很少,miR-93-5p是否在PCOS中发挥作用尚不明确^[15,16]。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子1A(CDKN1A)在多种肿瘤中可抑制肿瘤细胞的生长增殖,是细胞周期的负性调控因子,为一种典型的抑癌基因,尽管CDKN1A在多种恶性肿瘤中的作用已有一定的研究^[17,18],但是关于其抑制PCOS卵巢颗粒样瘤细胞株KGN生长增殖的研究报道还较少。据此,本研究拟以上述研究背景为基础,证实CDKN1A是miR-93-5p直接调控的靶基因,并证实miR-93-5p可通过抑制其靶基因CDKN1A而促进PCOS卵巢颗粒样瘤细胞株KGN的生长增殖。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

① miR-93-5p模拟物(miR-93-5p mimics)及其对照scramble-1、miR-93-5p抑制剂(miR-93-5p inhibitor)及其对照scramble-2均购自Ambion公司。② 兔抗人型CDKN1A的单抗及 β -actin的多抗均购自CAT公司;③ 辣根过氧化物酶所标记的羊抗兔型二抗购自博士德公司(武汉)。④ pcDNA3.1-CDKN1A重组质粒(CDKN1A),pcDNA3.1的空载体对照(vector)购自GeneCopoeia公司。⑤ 突变/野生型CDKN1A的3'-非翻译区(3'-UTR)的荧光素酶报告载体CDKN1A-mut/CDKN1A-wt经

GeneCopoeia公司设计。⑥ 双荧光素酶活性测定试剂盒购自Promega公司;⑦ Lipofectamine 2000型转染试剂和Trizol购自Invitrogen公司;⑧ 蛋白提取的试剂盒购自BestBio公司;⑨ ECL化学发光测定试剂盒以及BCA蛋白定量的测定试剂盒购自Thermo公司;⑩ MTT细胞的增殖/毒性检测试剂盒购买于Sigma公司。

1.2 样本来源

选取我院2016年6月-2019年6月期间确诊的40例PCOS患者,收集其卵巢组织和病灶旁正常组织进行研究,其中PCOS的诊断标准为:(1)稀发排卵亦或是无排卵。(2)高雄激素血症亦或是存在多毛或痤疮等高雄激素症状表现。(3)B超需在患者的月经周期亦或是黄体期撤退之后出血的3~5天检测,若结果表明双侧的卵巢均含有超过12个的直径为2~9 mm小卵泡,换言之卵巢有多囊样变化,且卵巢体积相对增大(即每侧>10 mL,其中卵巢体积为 $0.5 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{厚}$)^[19]。诊断时需除外高雄激素血症或其它因素,所有病例均签署了知情同意书。40例PCOS病变组织和正常对照组织均保存于液氮中用于提取RNA。

1.3 细胞培养

人PCOS卵巢颗粒样瘤细胞株KGN细胞(购自上海生命科学院中的生化细胞所)培养条件:① 10%胎牛血清(FBS, HycloneLaboratories);② 100 U/mL的青霉素;③ 0.1 mg/mL的链霉素(双抗,Invitrogen)型DMEM/F12培养基(Sigma)当中;④ 细胞存于37℃,且有5%CO₂的培养箱中实施孵育。

1.4 转染miRNA和质粒

在细胞生长汇合度达到80-90%时采集细胞,并经10%FBS的有关DMEM/F12培养基将其稀释成 $1 \sim 5 \times 10^4$ 个/mL细胞悬液。以2 mL每孔加进6孔板,直至细胞的汇合度是60%~80%后预备转染。再用EP管配制好lipofectamin 2000以及转染试剂(如质粒亦或是miRNA的前体),而后混匀,在室温下放置约20 min。将混合物同不含抗生素的无血清培养液均匀混合,添加至待转染6孔板内,并在培养箱内培养约6h之后更换为常规的培养基。等待48 h,采集细胞并提取其蛋白或是RNA,实施后续实验。

1.5 RNA的提取及qRT-PCR的检测

将存于液氮内的PCOS组织及用于正常对照的组织样品各100 mg,依次加至700 mL的TRIZol reagent (Invitrogen, USA)中研磨。而细胞系的总RNA在提取时为每6孔板内添加100 μ L的TRIZol,剩余试剂按比例减少。在室温下5 min后添加140 mL的氯仿,而后震荡15s继续在室温下放置约5 min。

再给予 4℃ 下 15 min 的 12000 rpm 离心。将上层清液吸取至另一个 EP 管内,以 0.5 mL 的异丙醇 /mL Trizol 这一比例添加异丙醇并混匀,在室温下放置约 10 min,而后离心并弃去上清。用 1 mL 75% 的乙醇对沉淀洗涤,于 4℃ 下行 5 min 7500 rpm 的离心,而后弃去上清,并在室温下干燥,添加 30 μ L 的无 RNase 双蒸水进行溶解。提取 1 μ L 测定 RNA 的浓度和纯度,而后放于 -20℃ 下保存备用。将自组织亦或是细胞系内所提取的有关总 RNA 用于模板,按照逆转录试剂盒 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, UK) 说明书实施操作,将其逆转录形成 cDNA。再将 cDNA 作为模板,通过 qSYBR-Green-containing PCR kit (Qiagen, USA) 的说明书常规操作,所用设备是 BioRad 公司的 IQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (USA)。miR-93-5p 和 SOX2 的引物由 Invitrogen 公司合成,将 U6 作为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 算出相对表达量。其中 $\Delta\Delta C_T$ 为 $(C_T \text{ miRNA} - C_T \text{ U6})_{\text{target}} - (C_T \text{ miRNA} - C_T \text{ U6})_{\text{control}}$ 。总反应体系是 20 μ L,每组实验设置三个复孔。

1.6 荧光素酶活性检测 miR-93-5p 靶基因

将实验分成四组:(1)miR-93-5p mimics 与 CDKN1A-wt;(2)scramble 与 CDKN1A-wt;miR-93-5p mimics;(3)CDKN1A-mut;(4)scramble 与 CDKN1A-mut。依次转染四组至 PCOS 的卵巢颗粒样瘤有关细胞株的 KGN 细胞内,在 48 h 后对细胞进行采集。通过双荧光素酶活性测定试剂盒内的说明书进行操作。并用单光子检测仪(Biorad 公司,USA)对荧光素酶的活性实施测定。各组实验均设置 3 个复孔。

1.7 Western blot 测定 KGN 细胞中 CDKN1A 的蛋白表达改变 将实验分四组:miR-93-5p mimics 及其对照 scramble-1; miR-93-5p inhibitor 及对照 scramble-2。依次转染至 KGN 细胞内,在 48 h 之后将细胞总蛋白进行提取,用 BCA 法对蛋白浓度实施测定。依次取 30 μ g 的样本,实施 10% SDS-PAGE 的凝胶电泳试验。而后将蛋白转到 PVDF 膜,在 5% BSA 室温下封闭约 1-2 h,添加 1:2000 比例的兔抗人型 CDKN1A 抗体以及 1:1000 比例的兔抗人型 β -catin 抗体,4℃ 过夜。用 TBST 洗膜计 3 次,10 min/次,添入 1:800 比例的羊抗兔型二抗,在室温下孵

育约 1 h,以 TBST 洗膜计 3 次,10 min/次。添加 ECL 发光剂经 X 片予以曝光和显影,以及定影,而后扫描保存有关条带影像。通过 Quantity One 软件实施处理,将目的蛋白 α -CDKN1A 条带及 β -actin 蛋白二者的灰度值比值记录目的蛋白自身的相对表达水平,为每组试验均设置 3 个复孔。

1.8 MTT 法测定 miR-93-5p 及 CDKN1A,以及 KGN 增殖活性评价

将实验分六组:(1)miR-93-5p 与 scramble;(2)CDKN1A 与 vector;(3)miR-93-5p+CDKN1A 与 scramble+vector。依次转染至 KGN 细胞,并为每组设置共 6 个复孔,为未接种细胞的有关孔内添加 DMEM 作为调零孔。完成转染之后可在培养箱内进行 48 h 的培养,而后为每孔添加 30 μ L MTT,并在 37℃ 下孵育约 2 h。为每孔添加 150 μ L 的 DMSO。给予 10 min 的低速振荡待结晶物得到完全融解。通过酶标仪检测 492 nm 波长下的 OD492。且增殖活性为(处理组 - 调零孔) / (对照组 - 调零孔) $\times$ 100%,为各组实验均设置 3 个复孔,其中对照组是 scramble 组亦或是 vector 组。

1.9 统计学处理

用 SPSS21.0 统计学软件对数据实施分析。计量资料以均值 $\pm$ 标准差这一形式加以表示。两组间的数据对比选择成组 t 检验,而多组间的数据对比选择单因素方差分析及 LSD-t 检验。当 $P < 0.05$ 时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-93-5p 在卵巢组织内的表达

qRT-PCR 测定 miR-93-5p 在 PCOS 卵巢组织中的表达,结果显示:与正常卵巢组织的 (0.80 ± 0.11) 进行比较,miR-93-5p 在 PCOS 卵巢组织中表达上调为 (1.18 ± 0.13) ,差异有统计学意义 ($t=14.113, P=0.000$),见图 1A。进一步检测 CDKN1A 在 PCOS 卵巢组织中的表达,与正常卵巢组织 (1.17 ± 0.07) 进行比较,我们发现 CDKN1A 在 PCOS 卵巢组织中表达显著下调 (0.78 ± 0.09) ,差异有统计学意义 ($t=21.633, P=0.000$),见图 1B。

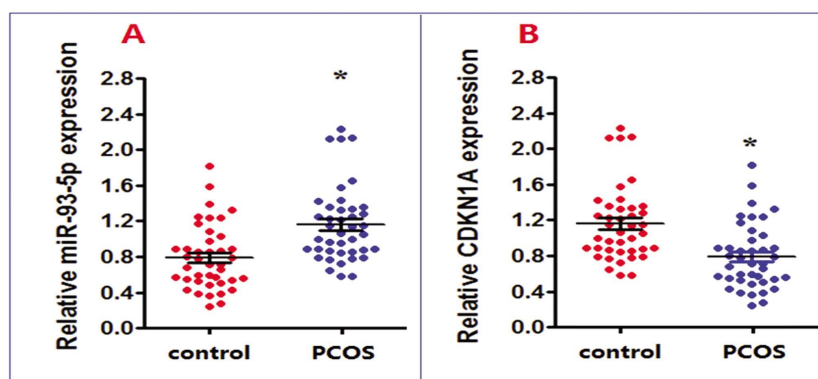


图 1 miR-93-5p 和 CDKN1A 在卵巢组织中的表达水平

Fig. 1 The expression levels of mir-93-5p and CDKN1A in ovarian tissue

Note: Compared with the control, $*P < 0.05$.

2.2 TargetScan 软件预测及荧光素酶报告载体实验结果

通过 TargetScan 在线软件预测,结果显示 CDKN1A 是 miR-93-5p 直接调控的靶基因(见图 2A)。使野生/突变型的

CDKN1A 自身 3'-UTR 克隆至目的基因下游,依次使 CDKN1A-wt/mut 及 miR-93-5p 模拟物(即 miR-93-5p mimics),以及无关对照的寡核苷酸序列(即 scramble)共转染到 KGN 细胞

中。测定荧光素酶的活性,结果表明:共转染 CDKN1A-wt 以及 miR-93-5p mimics 时,活性强度降低约 40.9%,差异有统计学意义 $[(1.03 \pm 0.08) \text{vs} (0.60 \pm 0.06), t=10.533, P=0.000]$;共转染 CDKN1A-mut 以及 miR-93-5p mimics/scramble 时,活性强度并无显著差别 $[(1.02 \pm 0.06) \text{vs} (0.99 \pm 0.06), t=0.866, P=0.407]$,见图 2B。换言之,CDKN1A 属于 miR-93-5p 可直接调控的重要靶基因。为明确 miR-93-5p 是否可通过调控 CDKN1A 从而影响卵巢颗粒瘤细胞 KGN 的生长增殖,我们分别转染 miR-93-5p mimics 及其对照 scramble-1, miR-93-5p inhibitor 以

及对对照 scramble-2 到 KGN 细胞中,qRT-PCR 和 Western Blot 分别检测 CDKN1A 的 mRNA 及蛋白表达水平。结果显示,与 scramble-1 组相比,miR-93-5p mimics 组 CDKN1A 的 mRNA 及蛋白表达明显下降 $[(1.12 \pm 0.08) \text{vs} (0.43 \pm 0.06), t=16.901, P=0.000; (0.83 \pm 0.07) \text{vs} (0.39 \pm 0.06), t=11.690, P=0.000]$;与 scramble-2 组相比,miR-93-5p inhibitor 组 CDKN1A 的 mRNA 及蛋白表达明显升高 $[(1.01 \pm 0.04) \text{vs} (1.63 \pm 0.09), t=15.420, P=0.000; (0.83 \pm 0.02) \text{vs} (0.98 \pm 0.06), t=5.809, P=0.000]$,见图 2C 和图 2D。

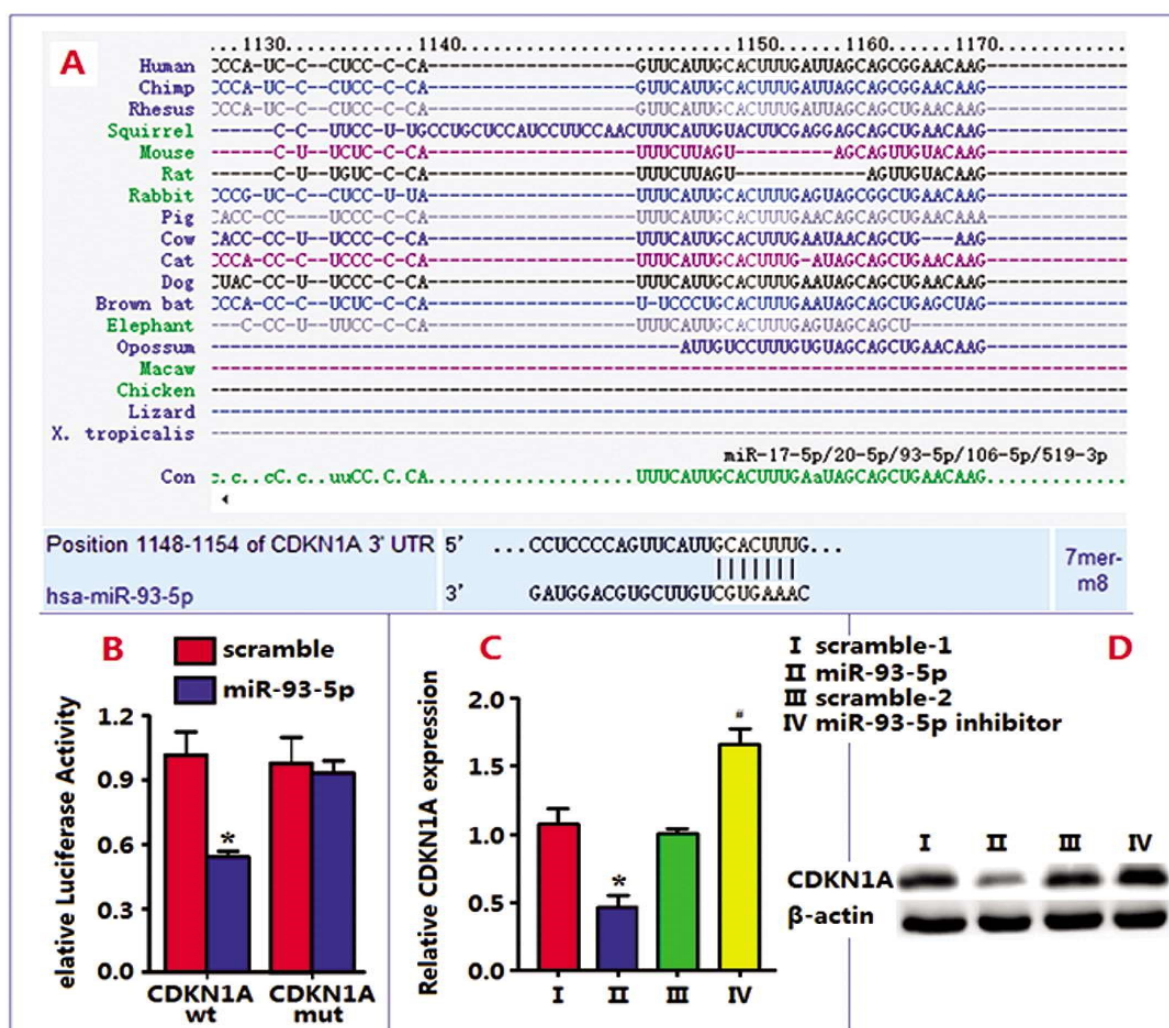


图 2 TargetScan 软件预测和荧光素酶报告载体实验结果

Fig. 2 The results of TargetScan software predictions and luciferase reporter assays

Note: A: Targetscan software prediction and Luciferase Report; B: The activity of fluorescein in CO transfection of CDKN1A wt and CDKN1A mut;

C: Relative expression of CDKN1A mRNA in each group, Compared with the scramble-1 group, * $P < 0.05$;

compared with the scramble-2 group, * $P < 0.05$. D: Relative expression of CDKN1A protein in each group.

2.3 miR-93-5p 通过靶向 CDKN1A 促进卵巢颗粒瘤细胞 KGN 的生长增殖

MTT 实验共分六组, 分别为:scramble 组、miR-93-5p 组、vector 组、CDKN1A 组、scramble+vector 组和 miR-93-5p+CDKN1A 组。在转染 48 h 后,MTT 法测定细胞生长增殖的活性。与 scramble 组 (99.32 ± 1.38) 相比,miR-93-5p 组的细胞增殖能力 (173.64 ± 8.16) 明显升高 $(t=21.997, P=0.000)$;与 vector 组

(96.32 ± 1.12) 比较,CDKN1A 组细胞增殖能力 (43.72 ± 1.85) 显著降低 $(t=59.578, P=0.000)$;与 miR-93-5p 组比较,miR-93-5p+CDKN1A 组细胞增殖能力 (64.32 ± 3.31) 显著降低 $(t=30.409, P=0.000)$,而与 CDKN1A 组比较,miR-93-5p+CDKN1A 组细胞增殖能力显著增加,差异具有统计学意义 $(t=13.307, P=0.000)$ 。见图 3。

3 讨论

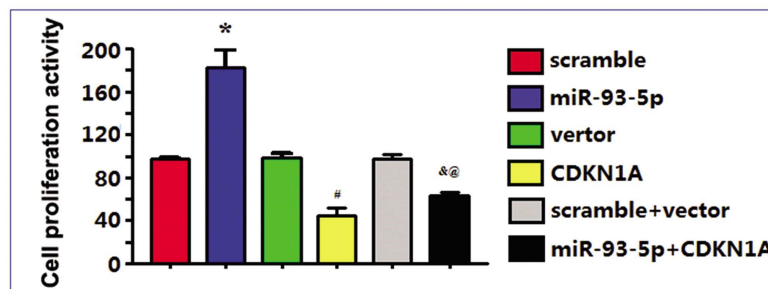


图3 MTT 检测 KGN 细胞的增殖能力

Fig.3 Detection of KGN cell proliferation by MTT

Notes: Compared with the scramble group, * $P < 0.05$; compared with the vector group, # $P < 0.05$; compared with the miR-93-5p group, @ $P < 0.05$; compared with the CDKN1A group, @ $P < 0.05$.

多囊卵巢综合征(PCOS)是常见内分泌疾病,在育龄妇女中高发^[20]。据文献报道,PCOS主要的临床表现为月经周期紊乱,不孕,毛发多,肥胖,雄激素过高等^[21-22]。PCOS患者易发生胰岛素抵抗、高胰岛素血症、非胰岛素依赖型的II型糖尿病、心血管类疾病及睡眠窒息等疾病^[23,24]。多囊卵巢综合征的患病率存在调查对象、区域、种族和诊断标准的差异^[25]。因此,在基因层面分析此病的内在联系具有重要的意义。本文通过验证CDKN1A是miR-93-5p直接调控的靶基因,阐明miR-93-5p可通过靶向CDKN1A促进人卵巢颗粒样肿瘤细胞系KGN的生长增殖,以期更加详实地剖析PCOS疾病的基因学机制。miR-93-5p在PCOS中发挥类似于癌基因的作用,在PCOS中高表达。而过表达的miR-93-5p可以通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子1A的表达,促进PCOS卵巢颗粒瘤细胞KGN的生长、增殖,而CDKN1A在多种肿瘤中发挥抑制肿瘤细胞的生长增殖的作用,CDKN1A是细胞周期的负性调控因子,是一种代表性的抑癌基因,CDKN1A被抑制则意味着细胞增殖活性被激活,导致疾病的进展^[26,27]。我们研究已表明miR-93-5p在PCOS卵巢组织中表达上调,且CDKN1A在PCOS的卵巢组织中表达下调。并证实miR-93-5p是通过直接靶向CDKN1A而促进PCOS卵巢颗粒样瘤细胞株KGN的生长增殖。

miR-106b-25家族包括miR-93,miR-25和miR-106b三名成员,其中miR-93具有茎环结构前体,根据miR-93在细胞核外的剪接位点的不同分为miR-93-3p和miR-93-5p^[28,29]。目前对miR-93研究较多,对miR-93-5p的研究极少,对miR-93-5p和PCOS之间相互关系的研究几乎没有。细胞周期相关基因CDKN1A是一种肿瘤抑癌基因,常在多种肿瘤组织中突变,与多种疾病的发生发展之间关系密切,目前关于miR-93-5p和CDKN1A在PCOS中的作用研究较少,具体机制不明^[30]。为验证CDKN1A是否为miR-93-5p直接调控的靶基因,并阐明miR-93-5p是否可通过靶向CDKN1A促进PCOS卵巢颗粒样瘤细胞系KGN的生长增殖。采用多种分子生物学技术来探究miR-93-5p、CDKN1A与PCOS的关系。生物信息学软件TargetScan对miR-93-5p靶基因实施预测,通过荧光素酶报告基因试验测定CDKN1A活性,并用qRT-PCR测定CDKN1A的有关mRNA表达,以Western blot法测定CDKN1A蛋白表达。同时通过MTT细胞增殖的试验从功能上对miR-93-5p直

接靶向CDKN1A促进卵巢颗粒细胞KGN的生长予以验证。通过转染miR-93-5p到KGN细胞中,发现miR-93-5p能显著促进KGN细胞的生长。且过表达CDKN1A能够减少miR-93-5p对KGN细胞生长增殖的促进作用。

综上,miR-93-5p可通过直接靶向CDKN1A,抑制细胞周期相关基因CDKN1A的表达,从而促进PCOS卵巢颗粒瘤细胞KGN的生长。后续将进行miR-93-5p直接靶向CDKN1A促进多囊卵巢颗粒细胞瘤生长的机制研究,为PCOS的治疗及防治提供新的思路,为临床治疗提供药物作用的新靶点。

参考文献(References)

- [1] Meier RK. Polycystic Ovary Syndrome[J]. Nurs Clin North Am, 2018, 53(3): 407-420
- [2] 孙小玲,王静,孙彦欣,等. 育龄期多囊卵巢综合征患者健康相关生活质量现状分析[J]. 生殖医学杂志, 2019, 28(12): 1416-1421
- [3] Polak K, Czyzyk A, Simoncini T, et al. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome[J]. J Endocrinol Invest, 2017, 40(1): 1-8
- [4] Tushev G, Glock C, Heumüller M, et al. Alternative 3' UTRs Modify the Localization, Regulatory Potential, Stability, and Plasticity of mRNAs in Neuronal Compartments[J]. Neuron, 2018, 98(3): 495-511
- [5] Zheng W, Fan W, Feng N, et al. The Role of miRNAs in Zearalenone-Promotion of TM3 Cell Proliferation [J]. Int J Environ Res Public Health, 2019, 16(9): 1517
- [6] Ran X, Xiao CH, Xiang GM, et al. Regulation of Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation by MicroRNAs[J]. Cell Reprogram, 2017, 19(3): 150-158
- [7] 许艳,张淑娟,常志强,等. 整合分析基因表达与拷贝数变异识别癌症的驱动基因及调控子miRNAs [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(5): 940-943
- [8] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16(3): 203-222
- [9] Naji M, Aleyasin A, Nekoonam S, et al. Differential Expression of miR-93 and miR-21 in Granulosa Cells and Follicular Fluid of Polycystic Ovary Syndrome Associating with Different Phenotypes [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 14671
- [10] 王洁,王倩,崔趁趁,等. 多囊卵巢综合征患者血清外泌体中差异表达microRNAs及其功能分析[J]. 山东医药, 2019, 59(6): 35-38
- [11] Tang B, Xuan L, Tang M, et al. miR-93-3p alleviates

- lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by inhibiting toll-like receptor 4[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(10): 1686-1693
- [12] Sun XY, Han XM, Zhao XL, et al. MiR-93-5p promotes cervical cancer progression by targeting THBS2/MMPS signal pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(12): 5113-5121
- [13] 李英, 张学军. miR-93 在多囊卵巢综合征患者血清中的表达及临床意义[J]. *天津医科大学学报*, 2018, 24(3): 209-211, 215
- [14] Yang Y, Jia B, Zhao X, et al. miR-93-5p may be an important oncogene in prostate cancer by bioinformatics analysis [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 10463-10483
- [15] Butler AE, Ramachandran V, Hayat S, et al. Expression of microRNA in follicular fluid in women with and without PCOS[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 16306
- [16] Jiang L, Huang J, Li L, et al. MicroRNA-93 promotes ovarian granulosa cells proliferation through targeting CDKN1A in polycystic ovarian syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(5): E729-E738
- [17] 朱萧, 杨伟萍, 覃庆洪, 等. CDKN1A 基因在乳腺癌组织中的表达及其与乳腺癌生物学特性的关系[J]. *广西医科大学学报*, 2017, 34(11): 1546-1549
- [18] Wisnieski F, Calcagno DQ, Leal MF, et al. CDKN1A histone acetylation and gene expression relationship in gastric adenocarcinomas[J]. *Clin Exp Med*, 2017, 17(1): 121-129
- [19] 刘霞, 余传金, 刘欣梅, 等. 多囊卵巢综合征的病因及诊断标准[J]. *实用妇产科杂志*, 2018, 34(8): 561-564
- [20] Papalou O, Diamanti-Kandarakis E. The role of stress in PCOS[J]. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 2017, 12(1): 87-95
- [21] Misso ML, Teede HJ. Metformin in women with PCOS, cons [J]. *Endocrine*, 2015, 48(2): 428-433
- [22] Teede HJ, Legro RS, Norman RJ. A Vision for Improving the Assessment and Management of PCOS through International Collaboration[J]. *Semin Reprod Med*, 2018, 36(1): 3-4
- [23] Jeanes YM, Reeves S. Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: diagnostic and methodological challenges[J]. *Nutr Res Rev*, 2017, 30(1): 97-105
- [24] 李杨, 闫洪亮, 胡同秀, 等. Irisin 与多囊卵巢综合征代谢紊乱的研究进展[J]. *国际妇产科学杂志*, 2020, 47(1): 88-91
- [25] Bozdag G, Mumusoglu S, Zengin D, et al. The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *Hum Reprod*, 2016, 31(12): 2841-2855
- [26] Li X, Pishdari B, Cui P, et al. Regulation of Androgen Receptor Expression Alters AMPK Phosphorylation in the Endometrium: In Vivo and In Vitro Studies in Women with Polycystic Ovary Syndrome[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(12): 1376-1389
- [27] 郑赛花, 李雪莲. MicroRNA 在多囊卵巢综合征中的表达及作用[J]. *国际生殖健康计划生育杂志*, 2016, 35(2): 146-150
- [28] Sárközy M, Káhn Z, Csont T. A myriad of roles of miR-25 in health and disease[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(30): 21580-21612
- [29] Li HY, Liang JL, Kuo YL, et al. miR-105/93-3p promotes chemoresistance and circulating miR-105/93-3p acts as a diagnostic biomarker for triple negative breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19(1): 133
- [30] Pandya JA, Boaz K, Natarajan S, et al. A correlation of immunohistochemical expression of TP53 and CDKN1A in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma [J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(3): 666-670