

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.18.004

miR-155-5p 增强卵巢癌细胞 UWB1.289 对 PARP 抑制剂的敏感性*

盛辰晨 何乐伟 王 充 张春晓 杨诗敏 席晓薇[△]

(上海交通大学附属第一人民医院妇产科 上海 200080)

摘要 目的: 探讨卵巢癌细胞 UWB1.289 中 miR-155-5p 对 PARP 抑制剂敏感性的影响及可能涉及的分子机制研究。**方法:** 采用 qRT-PCR 技术检测 miR-155-5p 在有 BRCA1/2 突变和无 BRCA1/2 突变的卵巢癌组织及卵巢癌细胞中的表达情况。利用细胞转染、qRT-PCR 以及 Western Blot 技术检测转染 miR-155-5p 模拟物和抑制剂的卵巢癌细胞 UWB1.289 中 miR-155-5p 的表达以及同源重组修复相关基因 SIRT1、BRG1 的表达。通过双荧光素酶报告基因实验验证 miR-155-5p 与 SIRT1、BRG1 之间的靶向性。运用 CCK-8 检测卵巢癌细胞 UWB1.289 中 miR-155-5p 对 PARP 抑制剂敏感性的影响。**结果:** 与无 BRCA1/2 突变的卵巢癌组织及卵巢癌细胞相比,miR-155-5p 在有 BRCA1/2 突变的卵巢癌组织及卵巢癌细胞中低表达。转染 miR-155-5p 模拟物可增加卵巢癌细胞 UWB1.289 中 miR-155-5p 的表达,同时降低同源重组修复相关基因 SIRT1、BRG1 的表达;转染 miR-155-5p 抑制剂可下调卵巢癌细胞 UWB1.289 中 miR-155-5p 的表达,同时增加 SIRT1、BRG1 的表达,进一步通过双荧光素酶报告基因实验证实 miR-155-5p 与 SIRT1、BRG1 存在特异性靶向结合序列。与对照组相比,干扰同源重组修复相关基因以及 miR-155-5p 过表达均可增强卵巢癌细胞 UWB1.289 对 PARP 抑制剂的敏感性。**结论:** miR-155-5p 可能通过影响同源重组修复基因增强卵巢癌细胞 UWB1.289 对 PARP 抑制剂的敏感性。

关键词: miR-155-5p; 卵巢癌; PARP 抑制剂; 敏感性; 同源重组修复

中图分类号: R-33; R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2022)18-3420-08

miR-155-5p Enhances the Sensitivity of Ovarian Cancer Cell UWB1.289 to PARP Inhibitors*

SHENG Chen-chen, HE Le-wei, WANG Chong, ZHANG Chun-xiao, YANG Shi-min, XI Xiao-wei[△]

(Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of miR-155-5p on the sensitivity of ovarian cancer cell UWB1.289 to PARP inhibitors, and to explore the possible molecular mechanism. **Methods:** qRT-PCR was used to detect the expression of miR-155-5p in BRCA1/2-mutated and non-BRCA1/2-mutated ovarian cancer tissues and ovarian cancer cells. Cell transfection, qRT-PCR and Western Blot techniques were used to detect the expression levels of miR-155-5p, as well as homologous recombination repair-related genes SIRT1 and BRG1 in ovarian cancer cell UWB1.289, which were transfected with miR-155-5p mimics or miR-155-5p inhibitor. The targeting of miR-155-5p to SIRT1 and BRG1 were verified by dual-luciferase reporter gene assay. The effect of miR-155-5p on the sensitivity of PARP inhibitors in ovarian cancer cell UWB1.289 was detected by CCK-8. **Results:** Compared with ovarian cancer tissues and ovarian cancer cells without BRCA1/2 mutation, miR-155-5p was lowly expressed in ovarian cancer tissues and cells with BRCA1/2 mutation. Transfection of miR-155-5p mimics could increase the expression of miR-155-5p in ovarian cancer cell UWB1.289, while reducing the expression of homologous recombination repair-related genes SIRT1 and BRG1; transfection of miR-155-5p inhibitor could down-regulate the expression of miR-155-5p in ovarian cancer cell UWB1.289, while increasing the expression of SIRT1 and BRG1. Further, the dual-luciferase reporter gene assay confirmed that miR-155-5p had specific targeted binding sequences to SIRT1 and BRG1. Compared with the control group, interfering with genes related to homologous recombination repair could enhance the sensitivity of ovarian cancer cell UWB1.289 to PARP inhibitors, and overexpression of miR-155-5p could also enhance the sensitivity of ovarian cancer cell UWB1.289 to PARP inhibitors. **Conclusions:** miR-155-5p could enhance the sensitivity of ovarian cancer cell UWB1.289 to PARP inhibitors by affecting homologous recombination repair genes.

Key words: MiR-155-5p; Ovarian cancer; PARP inhibitors; Sensitivity; Homologous recombination repair

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

Article ID: 1673-6273(2022)18-3420-08

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81772767)

作者简介:盛辰晨(1995-),女,硕士研究生,主要研究方向:妇科肿瘤,E-mail: 1137456042@qq.com

[△] 通讯作者:席晓薇,女,硕士生导师,教授,主要研究方向:妇科肿瘤,E-mail: xixiaowei1966@126.com

(收稿日期:2022-02-28 接受日期:2022-03-24)

前言

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤,目前手术切除联合化疗成为首选治疗策略^[1]。聚 ADP 核糖聚合酶抑制剂(PARP 抑制剂)为有 BRCA1 或 BRCA2(BRCA1/2)突变的卵巢癌患者提供了新的治疗方法,目前 PARP 抑制剂已被批准作为单一疗法用于铂敏感复发性 BRCA 突变高级别卵巢癌患者的维持治疗,但仍存在 PARP 抑制剂治疗的原发性或继发性耐药^[2-6]。已有文献报道 micro RNA 的表达情况与 PARP 抑制剂的药物反应具有一定的相关性^[7]。因此,探究潜在的 PARP 抑制剂耐药机制,寻找新的生物标志物,成为目前卵巢癌患者肿瘤药物耐药的热点和难点。

miR-155 位于人类 21 号染色体上,属非编码 RNA,最早发现与淋巴瘤有关^[8]。miR-155-5p 参与多种细胞生理活动,研究表明 miR-155 的异常表达与多种癌症的多重耐药具有一定相关性^[9-11]。沉默交配型信息调节因子 2 同源蛋白 1(silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1)是与染色质相关的脱乙酰基酶,参与 DNA 修复,DNA 受损后可重新分布在染色体上,SIRT1 下调可影响 RAD51 向 DNA 受损位点的募集^[12];SIRT1 可使染色质松弛从而促进同源重组(homologous recombination, HR)修复^[13]。SMARCA4(亦称 BRG1)是 SWI/SNF 复合体的核心 ATPase 亚基,被募集到 DNA 受损位点,通过与 RAD52 相互作用促进 HR 修复,调节 RAD51 聚合物的形成^[14]。PARP 抑制剂发挥作用是通过 HR 修复缺乏实现的,因而任何恢复 HR 修复的途径都可能减弱肿瘤细胞对 PARP 抑制剂的敏感性。通过 TargetScan 数据库预测到 SIRT1、BRG1 与 miR-155-5p 存在特异性结合位点。

miR-155-5p 能否影响卵巢癌细胞对 PARP 抑制剂的药物反应,目前尚无文献报道。基于已有研究及数据库预测结果,本研究通过改变 miR-155-5p 的表达观察其能否增强卵巢癌细胞 UWB1.289 对 PARP 抑制剂的敏感性,同时探究 miR-155-5p 与 HR 相关基因间可能存在的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人卵巢癌细胞株 A2780(ATCC 70079)、SKOV3(ATCC HTB-77)由上海市第一人民医院妇产科研究室保存,引进于 ATCC 细胞库,HO8910 以及 HEY 购自中国科学院细胞库(中国上海),卵巢癌细胞 UWB1.289(BRCA1 缺失)购自上海富衡生物;胎牛血清与 DMEM、Opti-MEM 培养液购自美国 Gibco 公司,UWB1.289 完全培养基购自上海富衡生物;0.25%胰蛋白酶及青霉素-链霉素溶液(100×)购于吉诺生物医药科技有限公司;RIPA 裂解液及 BCA 蛋白检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒及 ECL 化学发光测定试剂盒购自上海雅酶生物;兔源 SIRT1、BRG1、GAPDH 一抗试剂及辣根过氧化物酶所标记的羊抗兔型二抗均购于美国 Abcam 公司;Lipofectamine™ 3000 购于美国 Invitrogen 公司。RNA 快速提取试剂盒 EZ-press RNA Purification Kit 和 Tissue RNA Purification Kit PLUS 购自美国 EZBioscience;逆转录试剂盒 HyperScript III miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit

(by stem-loop)、HyperScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit with gDNA Remover、PCR 试剂盒 2× S6 Universal SYBR qPCR Mix 及 SIRT1、BRG1、GAPDH 引物购自新贝(上海)生物科技有限公司;miR-155-5p、U6 引物以及 miR-155-5p 模拟物(miR-155-5p mimics、miR-155-5p agomir)与模拟物对照(mimics NC、agomir NC)、miR-155-5p 抑制剂(miR-155-5p inhibitor)与抑制剂对照(inhibitor NC)均购自广州锐博生物技术有限公司;双荧光素酶活性测定试剂盒购自美国 Promega 公司;野生/突变型 SIRT1、BRG1 双荧光素酶报告质粒由上海吉满生物设计;小干扰 RNA(si-RNA)和对照物(si-NC)由和元生物技术(上海)股份有限公司设计;CCK-8 试剂盒购于日本 Dojindo 公司;奥拉帕利(Olaparib)由阿斯利康(上海)提供。

临床组织标本来源于我院妇产科,自 2018 年 11 月至 2021 年 11 月因卵巢肿瘤行手术切除并做过 BRCA 基因检测的病人。本次研究共收集 32 例标本,其中 12 例 BRCA1/2 突变(BRCA1/2+)标本,20 例无 BRCA1/2 突变(BRCA1/2-)的标本。所有卵巢组织样品离体后立即在液氮中冷冻并储存在 -80℃ 直至使用。组织标本由两名独立的病理学家分别确认,上海交通大学附属第一人民医院医学伦理委员会批准了该研究。所有入组患者均同意术中取材并于术前签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人卵巢癌细胞株 A2780、SKOV3、HO8910 以及 HEY 使用含 10%胎牛血清(FBS)及 1%双抗(100 U/mL 青霉素/链霉素)的 DMEM 培养基,UWB1.289 使用 UWB1.289 完全培养基,均放于 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中培养,肿瘤细胞生长至培养皿面积 80%时,以 0.25%的胰蛋白酶(含有 0.02% EDTA)消化,并传代培养。

1.2.2 细胞转染 取对数生长期的 UWB1.289 接种至 6 孔板,37℃ 培养箱中静置培养直至细胞融合度达到 60%-80%时进行转染。按照 Lipofectamine™ 3000 说明书转染 miR-155-5p mimics、miR-155-5p inhibitor、si-RNA 和相应对照物以及双荧光素酶报告质粒,转染 6-8 小时(h)后更换为无双抗的培养基,继续于 37℃ 培养箱中静置培养供后续实验使用。

1.2.3 RNA 提取与 qRT-PCR 按照 RNA 快速提取试剂盒 EZ-press RNA Purification Kit 和 Tissue RNA Purification Kit PLUS 说明书分别提取卵巢癌组织以及卵巢癌细胞中的总 RNA,使用丹诺尔(Denovix)超微量紫外可见分光光度计对提取的 RNA 进行浓度测定后放于 -20℃ 下保存备用。按照逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,使用 2× S6 Universal SYBR qPCR Mix 试剂盒以及 ThermoFisher 公司的 QuantStudio™ 6 and 7 Flex Real-Time PCR Systems Support 进行 PCR 检测。以 U6 与 GAPDH 分别作为内参,每组实验设置 3 个复孔,通过 2^{-ΔΔCt} 法计算所有基因的相对表达量。

1.2.4 双荧光素酶报告基因实验 取对数生长期的 UWB1.289 接种至 12 孔板,待细胞生长至适宜密度时进行转染。以 SIRT1 基因为例,实验分组如下:野生型 SIRT1 质粒(wt-SIRT1)+mimics NC、wt-SIRT1+miR-155-5p mimics、突变型 SIRT1 质粒(mut-SIRT1)+mimics NC、mut-SIRT1+miR-155-5p mimics,依次转染至 UWB1.289 中。48 h 后,依据双荧光素酶活性测定试剂盒说明书,以海肾荧光素酶用作校准荧

光,检测相对荧光素酶活性。各组实验均设置 3 个复孔。

1.2.5 Western Blot 技术检测蛋白表达 取对数生长期 UWB1.289,细胞转染 48 h 后,冰浴条件下,加入 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白;运用 BCA 法测定蛋白浓度,定量后蛋白上样,经 SDS-PAGE 分离蛋白,电泳结束转至 PVDF 膜,5 %脱脂奶粉室温封闭 90 min,4℃ 孵育一抗 SIRT1 (1:10000)、BRG1 (1:25000)、GAPDH (1:1000)过夜;TBST 洗膜 3 次,辣根过氧化物酶所标记的羊抗兔型二抗 (1:1000)室温孵育 90 min,TBST 洗 3 次,用化学发光法 (ECL) 检测目的蛋白的表达情况。Image J 软件分析条带灰度值。

1.2.6 CCK-8 实验 筛选药物浓度:取对数生长期 UWB1.289,胰酶消化重悬计数,调整细胞悬液浓度为 4×10^4 /mL,按照每孔 100 μ L 接种于 96 孔板,每组 5 个复孔。配制 Olaparib,设置浓度 (uM) 梯度为:0、0.1、1、10、100、1000,处理 48 h 后,加入 CCK-8 试剂,37℃ 培养箱内培养 2 h 后检测 450 nm 处吸光度。铺板方法同前,待细胞贴壁后分别转染 si-SIRT1、si-BRG1、miR-155-5p agomir 及相应对照物,24 h 后加入 Olaparib,设置浓度 (uM) 梯度为:0、200、400、600、800、1000,处理 48 h 后检测

方法同前。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism V8.0 软件进行数据分析。每组实验重复至少 3 次。计量资料均采用均数 $\pm$ 标准差表示,计量资料组间差异比较采用独立样本 t 检验,多组间差异比较选择单因素方差分析。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 BRCA1/2+ 的卵巢癌组织和细胞中 miR-155-5p 低表达

qRT-PCR 测定 miR-155-5p 在 BRCA1/2+ 及 BRCA1/2- 卵巢癌组织中的表达,结果显示:与 BRCA1/2- 卵巢癌组织 (1.181 ± 0.123) 相比,miR-155-5p 在 BRCA1/2+ 卵巢癌组织中的表达下降为 (0.599 ± 0.105),差异有统计学意义 ($P = 0.004$, $P < 0.05$),见图 1A。进一步检测 miR-155-5p 在卵巢癌细胞中的表达,与 A2780、SKOV3、HO8910 以及 HEY 相比,miR-155-5p 在 UWB1.289 中低表达,差异有统计学意义 (P 值均 < 0.05),见图 1B。

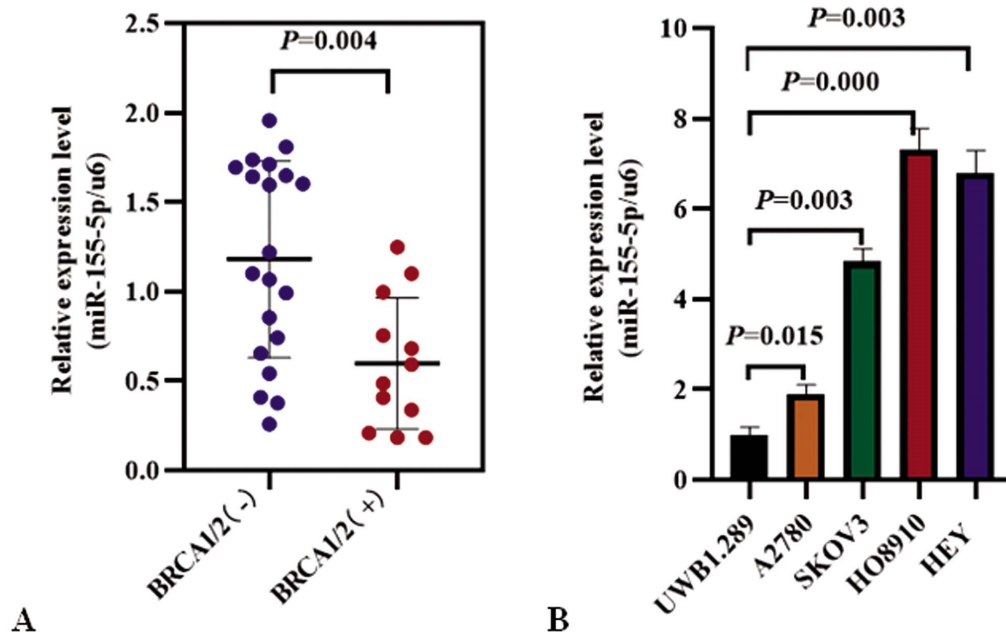


图 1 miR-155-5p 在卵巢癌组织和细胞株中的表达

注:A. miR-155-5p 在卵巢癌组织中的表达;(BRCA1/2+ 表示有 BRCA1/2 突变;BRCA1/2- 表示无 BRCA1/2 突变)B. miR-155-5p 在卵巢癌细胞中的表达。

Fig. 1 The expression of miR-155-5p in ovarian cancer tissues and cell lines

Note: A. miR-155-5p expression in ovarian cancer tissues; (BRCA1/2+ means BRCA1/2 mutation; BRCA1/2- means no BRCA1/2 mutation)

B. miR-155-5p expression in ovarian cancer cells.

2.2 转染 miR-155-5p mimics 或 inhibitor 后 miR-155-5p 在 UWB1.289 中的表达

qRT-PCR 测定 UWB1.289 转染 miR-155-5p mimics 或 inhibitor 24-48 h 后,与对照组相比,转染 miR-155-5p mimics 的 UWB1.289 细胞中,miR-155-5p 表达水平显著升高,差异有统计学意义 ($P = 0.000$, $P < 0.05$),见图 2A;与对照组相比,转染 miR-155-5p inhibitor 的细胞中,miR-155-5p 表达水平显著降低,差异有统计学意义 ($P = 0.000$, $P < 0.05$),见图 2B。

2.3 miR-155-5p 影响 SIRT1、BRG1 mRNA 的表达

利用 qRT-PCR 检测 UWB1.289 转染 miR-155-5p mimics 或 inhibitor 24-48 h 后,HR 相关基因 SIRT1、BRG1 mRNA 的变化,结果显示:过表达 miR-155-5p 可使 SIRT1 mRNA 水平降低,差异有统计学意义 ($P = 0.011$, $P < 0.05$);抑制 miR-155-5p 后 SIRT1 mRNA 水平升高,差异有统计学意义 ($P = 0.001$, $P < 0.05$),见图 3A。同样的分组与检测方法发现,过表达 miR-155-5p 可使 BRG1 mRNA 水平降低,差异有统计学意义 ($P = 0.001$, $P < 0.05$);

抑制 miR-155-5p 后 BRG1 mRNA 水平升高, 差异有统计学意义 ($P=0.000, P<0.05$), 见图 3B。综上, 在 RNA 水平上,

miR-155-5p 与 HR 相关基因 SIRT1、BRG1 的表达呈负相关。

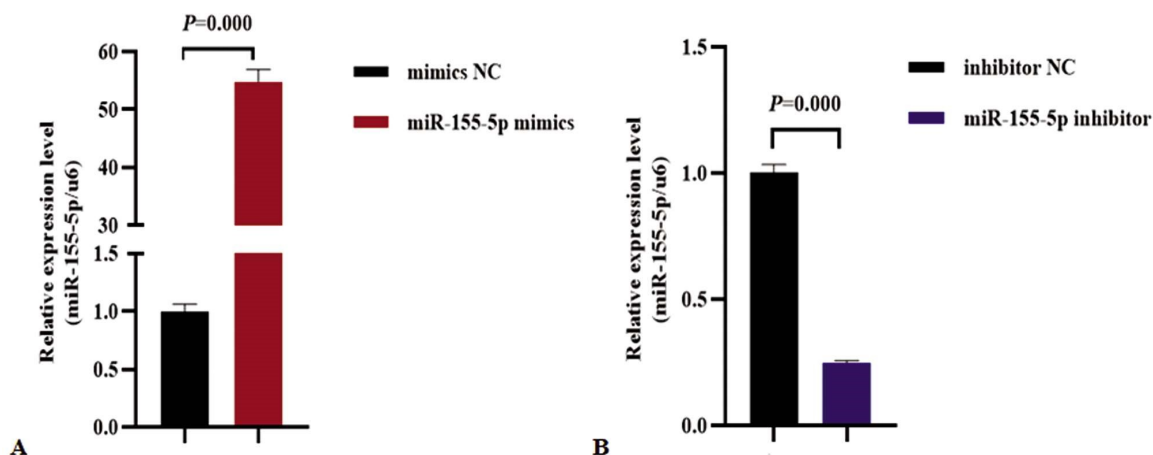


图 2 细胞转染后 miR-155-5p 在 UWB1.289 中的表达

注: A. 转染 miR-155-5p mimics 后 miR-155-5p 表达; B. 转染 miR-155-5p inhibitor 后 miR-155-5p 表达。

Fig. 2 The expression of miR-155-5p in UWB1.289 after cell transfection

Note: A. The expression of miR-155-5p after transfection with miR-155-5p mimics; B. The expression of miR-155-5p after transfection with miR-155-5p inhibitor.

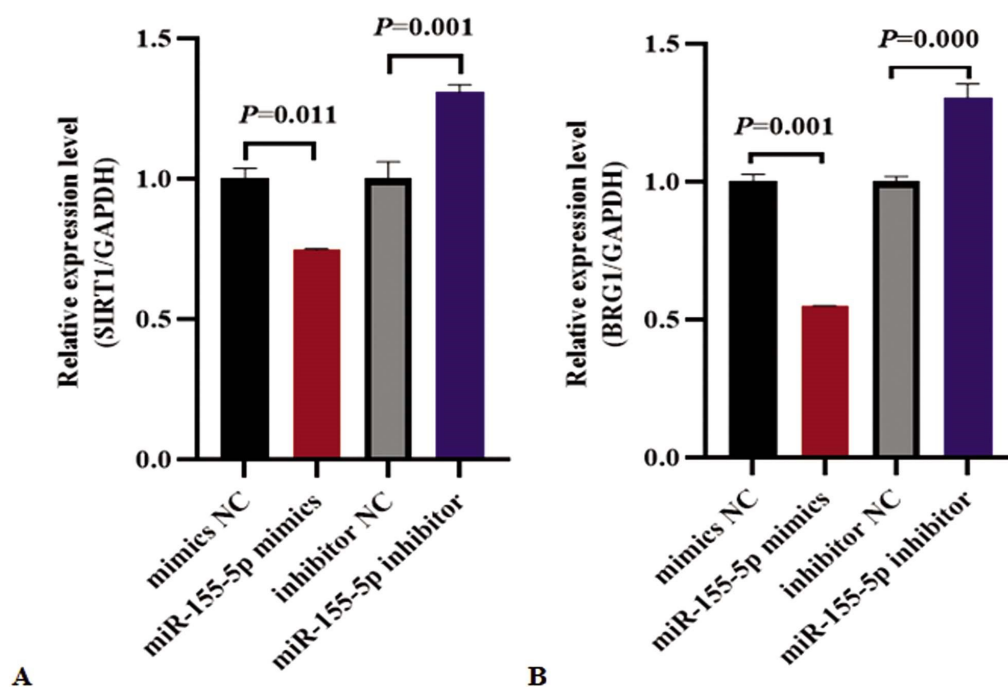


图 3 改变 miR-155-5p 的表达后 SIRT1、BRG1 mRNA 水平的相对表达变化

注: A. 改变 miR-155-5p 的表达后 SIRT1 mRNA 水平的表达变化; B. 改变 miR-155-5p 的表达后 BRG1 mRNA 水平的表达变化。

Fig. 3 The relative expression changes of SIRT1 and BRG1 mRNA levels after changing the expression of miR-155-5p

Note: A. The expression change of SIRT1 mRNA level after changing the expression of miR-155-5p; B. The expression change of BRG1 mRNA level after changing the expression of miR-155-5p.

2.4 miR-155-5p 调控 SIRT1、BRG1 蛋白水平的表达

使用 Western Blot 技术检测 UWB1.289 转染 miR-155-5p mimics 或 inhibitor 24-48 h 后 SIRT1、BRG1 蛋白水平变化, 结果显示: 与对照组相比, 转染 miR-155-5p mimics 的细胞中 SIRT1、BRG1 蛋白表达量显著降低, 差异有统计学意义 (P 值均 <0.05); 与对照组相比, 转染 miR-155-5p inhibitor 后 SIRT1、BRG1 蛋白表达量升高, 差异有统计学意义 (P 值均 <0.05), 见

图 4。由此可见, 在蛋白水平上, miR-155-5p 与 HR 相关基因 SIRT1、BRG1 的表达亦呈负相关。

2.5 miR-155-5p 可靶向结合 SIRT1、BRG1

通过 TargetScan 在线软件预测显示: SIRT1、BRG1 均具有 miR-155-5p 的结合位点, 见图 5A、5B。以 SIRT1 基因为例, 实验分组如下: 野生型 SIRT1 质粒 (wt-SIRT1) + mimics NC、wt-SIRT1 + miR-155-5p mimics、突变型 SIRT1 质粒

(mut-SIRT1)+ mimics NC、mut-SIRT1+ miR-155-5p mimics,依次转染至 UWB1.289 细胞中测定荧光素酶活性,结果表明:与对照组相比,共转染 wt-SIRT1+ miR-155-5p mimics 时,活性强度降低,差异有统计学意义($P=0.006, P<0.05$);共转染 mut-SIRT1+ miR-155-5p mimics 时,活性强度并无显著差别

($P=0.102, P>0.05$),见图 5C。同样实验分组与检测方法验证 miR-155-5p 与 BRG1 之间的靶向结合情况,野生组差异有统计学意义($P=0.000, P<0.05$),突变组差异无统计学意义($P=0.093, P>0.05$),见图 5D。由此验证了 miR-155-5p 与 SIRT1、BRG1 的靶向结合关系。

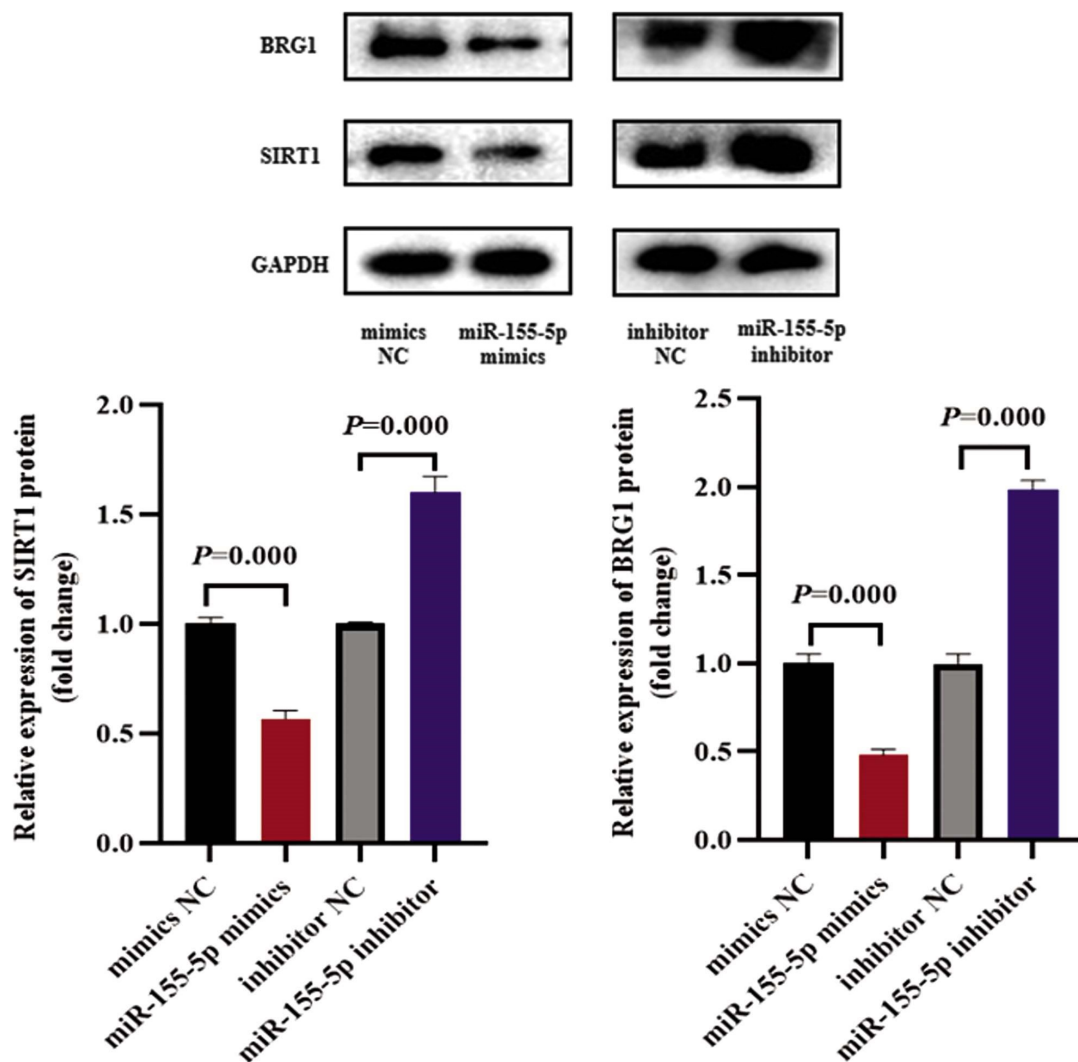


图4 改变 miR-155-5p 的表达后 SIRT1、BRG1 蛋白水平的相对表达变化

Fig. 4 The relative expression changes of SIRT1 and BRG1 protein levels after changing the expression of miR-155-5p

2.6 miR-155-5p 增强卵巢癌细胞 UWB1.289 对 Olaparib 的敏感性

CCK-8 法初步检测卵巢癌细胞 UWB1.289 对 Olaparib 的药物反应情况,药物浓度梯度设置如下:0、0.1、1、10、100、1000 (μM),处理 48 h,见图 6A;分别转染 si-SIRT1 与 si-NC,24 h 后加入 Olaparib,用不同剂量的 Olaparib (0、200、400、600、800、1000 μM) 处理 48 h 后 CCK-8 法测定 UWB1.289 的相对细胞活力,结果显示:SIRT1 下调增强了 UWB1.289 对 Olaparib 的反应,在浓度为 200、400、600、800 μM 时,差异有统计学意义(P 值均 <0.05),见图 6B;与上述方法一样,分别转染 si-BRG1 与 si-NC,相对细胞活力曲线表明:BRG1 下调增强了 UWB1.289 对 Olaparib 的反应,在浓度为 200、400 μM 时,差异有统计学意义(P 值均 <0.05),见图 6C;分别转染 miR-155-5p agomir 与 agomir NC,结果表明:过表达 miR-155-5p 可增加

UWB1.289 对 Olaparib 的敏感性,Olaparib 浓度在 200、400、600 μM 时,差异有统计学意义(P 值均 <0.05),见图 6D。结合双荧光素酶报告基因实验结果 miR-155-5p 可靶向结合 SIRT1、BRG1,由此推测:miR-155-5p 可能通过调控 SIRT1、BRG1 增强卵巢癌细胞 UWB1.289 对 Olaparib 的敏感性。

3 讨论

随着分子医学和肿瘤靶向治疗的发展,卵巢癌患者的临床疗效有很大提高,但总体预后仍较差^[15],其死亡率居妇科肿瘤首位,对全世界女性健康造成严重威胁^[16]。人体中的细胞因内外环境变化会出现 DNA 损伤,但细胞可启动 DNA 损伤反应系统,例如,DNA 双链断裂(Double strand breaks, DSBs)后通过 HR 和非同源末端连接两种途径修复,该反应系统的缺陷会导致癌细胞脆弱性增加,为我们提供了潜在有效的抗癌疗法^[17]。

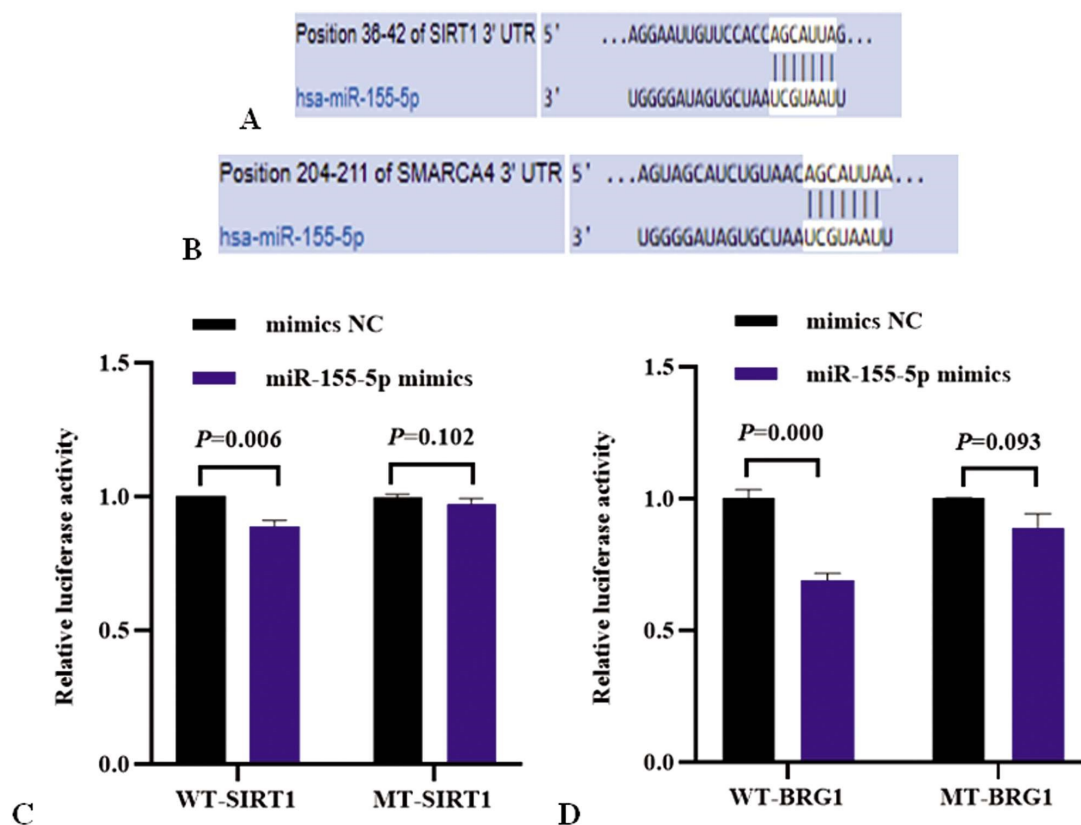


图 5 双荧光素酶报告基因实验表明 miR-155-5p 可以靶向结合 SIRT1、BRG1

注:A. SIRT1 与 miR-155-5p 的结合位点;B. BRG1 与 miR-155-5p 的结合位点;

C. miR-155-5p 可靶向结合 SIRT1;D. miR-155-5p 可靶向结合 BRG1。

Fig. 5 Dual-luciferase reporter gene assay showed that miR-155-5p could target SIRT1 and BRG1

Note: A. The binding site between SIRT1 and miR-155-5p; B. The binding site between BRG1 and miR-155-5p; C. miR-155-5p could target SIRT1;

D. miR-155-5p could target BRG1.

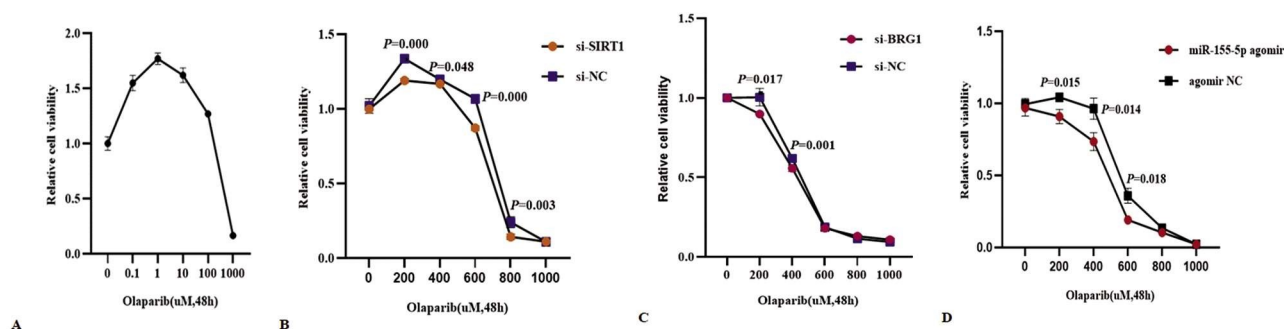


图 6 miR-155-5p 影响卵巢癌细胞 UWB1.289 对 Olaparib 的敏感性

注:A.不同剂量 Olaparib 对卵巢癌细胞 UWB1.289 的影响;B. SIRT1 下调增强了 UWB1.289 对 Olaparib 的反应; C. BRG1 下调增强了 UWB1.289 对 Olaparib 的反应; D.过表达 miR-155-5p 增加 UWB1.289 对 Olaparib 的敏感性。

Fig.6 miR-155-5p effected the sensitivity of ovarian cancer cell UWB1.289 to Olaparib

Note: A. The effect of different doses of Olaparib on ovarian cancer cell UWB1.289; B. Down-regulation of SIRT1 enhanced the response of UWB1.289 to Olaparib; C. Down-regulation of BRG1 enhanced the response of UWB1.289 to Olaparib; D. Overexpression of miR -155-5p increased the sensitivity of UWB1.289 to Olaparib.

Olaparib 系 PARP 抑制剂,作为一类新型的靶向药物,可使尚未修复的单链断裂转化为 DSBs,其在 HR 缺陷细胞中作用效果最强,HR 修复缺陷导致 DSBs 的敏感性增加^[18,19]。BRCA1/2 参与 HR 修复通路,发挥至关重要的作用。但只有约 30 %伴有 BRCA1/2 突变的卵巢癌患者显示出对 PARP 抑制剂治疗的总体反应^[20]。RAD51 是关键 HR 蛋白,其增加使癌细胞对 PARP

抑制剂的抗性增加,并具有建立损伤诱导的 RAD51 核病灶的能力^[21]。SIRT1 使 NRN1(MRN 复合体的一个成员)脱乙酰基化,从而促进 ATM 介导的 NBS1 磷酸化并促进 HR 过程^[22]。BRG1 作为染色质重塑复合物(SWI/SNF)的核心亚基,参与基因转录和 DNA 损伤反应。最新研究发现,SIRT1 介导的 BRG1 脱乙酰化极大地增强其酶促活性和 ATPase 依赖性染色质重塑

活性,降低核小体的密度,从而促进 DSBs 位点 RAD51 聚合物的形成,达到促进 HR 修复的作用,这一发现有待成为改善 DNA 损伤药物抗性的新靶点^[13]。

MicroRNA(miRNA)是一类广泛存在于真核生物中的长度约为 22 个核苷酸的非编码 RNA,可与靶基因的 3' 端非翻译区结合,导致 mRNA 降解或抑制蛋白质翻译^[23],进而参与细胞增殖、凋亡等多种细胞生物学行为和化疗耐药^[24,25]。此外,miRNA 的异常表达可通过影响细胞生物学行为而参与癌症进展^[26,27]。研究表明:miRNA 表达分析联合突变和基因表达特征,可能有助于评估同源重组的能力,提高预测乳腺癌对 PARP 抑制剂反应的能力^[28]。在多种癌症中,miR-155-5p 表达上调增加癌细胞的增殖、侵袭、迁移和血管生成能力,并影响癌症患者的预后^[29-31]。如,miR-155-5p 通过靶向 TP53INP1 促进宫颈癌细胞的转移^[32]。miR-155-5p 除影响细胞生物学行为外,还可影响癌细胞对肿瘤药物的敏感性。miR-155-5p 通过诱导细胞凋亡,增强西妥昔单抗对三阴性乳腺癌细胞的抗肿瘤作用^[33];在口腔鳞状细胞癌中,miR-155-5p 通过下调 TP53INP1 促进 5-氟尿嘧啶耐药^[34]。目前研究表明 miR-155-5p 通过靶向抗炎因子和免疫检查点增强抗癌免疫反应的能力,该过程可能与 PARP 抑制剂和免疫检查点抑制剂联合疗法有关^[35,36]。通过数据库预测 miR-155-5p 与 SIRT1、BRG1 存在特异性结合位点,因而本研究旨在探究 miR-155-5p 能否通过改变 HR 相关基因进而影响卵巢癌细胞 UWB1.289 对 PARP 抑制剂的药物反应。

本研究首先检测 miR-155-5p 在有 BRCA1/2 突变及无 BRCA1/2 突变卵巢癌组织中的表达,结果显示与无 BRCA1/2 突变卵巢癌组织相比,miR-155-5p 在有 BRCA1/2 突变的卵巢癌组织中低表达;与卵巢癌细胞 A2780、SKOV3、HO8910 及 HEY 相比,miR-155-5p 在 BRCA1 缺失的 UWB1.289 卵巢癌细胞中低表达。进一步通过 UWB1.289 细胞转染,利用 qRT-PCR 检测验证了 miR-155-5p 的过表达或抑制效率。通过 qRT-PCR 以及 Western Blot 技术检测过表达 miR-155-5p 后,SIRT1 及 BRG1 表达水平降低;而转染 miR-155-5p 抑制剂后,SIRT1 及 BRG1 表达水平升高,结果表明 miR-155-5p 对同源重组修复相关基因 SIRT1 及 BRG1 起调控作用。生物信息学软件 TargetScan 对 miR-155-5p 靶基因实施预测,通过双荧光素酶报告基因实验测定靶基因的相对荧光素酶活性,验证了 miR-155-5p 与 SIRT1、BRG1 的靶向结合关系。通过 CCK-8 实验,测定暴露于 Olaparib 的 UWB1.289 在干扰 HR 修复相关基因后的相对细胞活力,结果显示在一定的 Olaparib 浓度下,干扰 SIRT1、BRG1 可增强 UWB1.289 对 Olaparib 的反应性。与 miR-155-5p mimics 相比,miR-155-5p agomir 具有更高的稳定性,在复杂的环境中能保持更长时间的活性,同时具有更高的细胞透过率,在没有转染试剂的情况下,也可以克服细胞膜等障碍而进入靶细胞中发挥作用,因此探究 miR-155-5p 能否增强 UWB1.289 对 Olaparib 的反应时,使用 miR-155-5p agomir。结果显示过表达 miR-155-5p 可增加 UWB1.289 对 Olaparib 的敏感性。

综上所述,本研究结果表明 miR-155-5p 可增强卵巢癌细胞 UWB1.289 对 Olaparib 的敏感性,其机制可能与 miR-155-5p 参与调控同源重组修复相关基因进而影响该修复途径的恢复

有关,但深入的分子生物学机制有待进一步研究,以期为提高卵巢癌患者对 PARP 抑制剂敏感性提供理论依据和研究思路。

参考文献 (References)

- [1] Webb PM, Jordan SJ. Epidemiology of epithelial ovarian cancer [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2017, 41: 3-14
- [2] George A, Kaye S, Banerjee S. Delivering widespread BRCA testing and PARP inhibition to patients with ovarian cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14(5): 284-296
- [3] D'andrea AD. Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance [J]. DNA Repair (Amst), 2018, 71: 172-176
- [4] Chartron E, Theillet C, Guio S, et al. Targeting homologous repair deficiency in breast and ovarian cancers: Biological pathways, preclinical and clinical data[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2019, 133: 58-73
- [5] Hodgson DR, Dougherty BA, Lai Z, et al. Candidate biomarkers of PARP inhibitor sensitivity in ovarian cancer beyond the BRCA genes [J]. Br J Cancer, 2018, 119(11): 1401-1409
- [6] Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, et al. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. The Lancet Oncology, 2017, 18(9): 1274-1284
- [7] Szatkowska M, Krupa R. Regulation of DNA Damage Response and Homologous Recombination Repair by microRNA in Human Cells Exposed to Ionizing Radiation[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(7): 1838
- [8] Kong W, Yang H, He L, et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(22): 6773-6784
- [9] Yang LW, Wu XJ, Liang Y, et al. miR-155 increases stemness and decitabine resistance in triple-negative breast cancer cells by inhibiting TSPAN5[J]. Mol Carcinog, 2020, 59(4): 447-461
- [10] Gao Y, Liu Z, Ding Z, et al. MicroRNA-155 increases colon cancer chemoresistance to cisplatin by targeting forkhead box O3 [J]. Oncol Lett, 2018, 15(4): 4781-4788
- [11] Bayraktar R, Van Roosbroeck K. miR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics [J]. Cancer Metastasis Rev, 2018, 37(1): 33-44
- [12] Oberdoerffer P, Michan S, Mcvay M, et al. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging[J]. Cell, 2008, 135(5): 907-918
- [13] Chen Y, Zhang H, Xu Z, et al. A PARP1-BRG1-SIRT1 axis promotes HR repair by reducing nucleosome density at DNA damage sites[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(16): 8563-8580
- [14] Qi W, Wang R, Chen H, et al. BRG1 promotes the repair of DNA double-strand breaks by facilitating the replacement of RPA with RAD51[J]. J Cell Sci, 2015, 128(2): 317-330
- [15] Boussios S, Karathanasi A, Zakyntinakis-Kyriakou N, et al. Ovarian carcinosarcoma: Current developments and future perspectives [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2019, 134: 46-55
- [16] Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian Cancer: An Integrated Review[J]. Semin Oncol Nurs, 2019, 35(2): 151-156
- [17] Pilie PG, Tang C, Mills GB, et al. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol,

- 2019, 16(2): 81-104
- [18] Mirza MR, Coleman RL, Gonzalez-Martin A, et al. The forefront of ovarian cancer therapy: update on PARP inhibitors [J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(9): 1148-1159
- [19] Slade D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment [J]. *Genes Dev*, 2020, 34(5-6): 360-394
- [20] Cashman R, Zilberberg A, Priel A, et al. A single nucleotide variant of human PARP1 determines response to PARP inhibitors [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2020, 4(1): 10
- [21] Ashworth A. Drug resistance caused by reversion mutation[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10021-10023
- [22] Opresko PL, Cheng WH, Bohr VA. Junction of RecQ helicase biochemistry and human disease [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (18): 18099-18102
- [23] Ali Syeda Z, Langden SSS, Munkhzul C, et al. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (5): 1723
- [24] Xu X, Wang Y, Mojumdar K, et al. A-to-I-edited miRNA-379-5p inhibits cancer cell proliferation through CD97-induced apoptosis[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(12): 5343-5356
- [25] Liu T, Zhang X, Du L, et al. Exosome-transmitted miR-128-3p increase chemosensitivity of oxaliplatin-resistant colorectal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 43
- [26] Lai X, Eberhardt M, Schmitz U, et al. Systems biology-based investigation of cooperating microRNAs as monotherapy or adjuvant therapy in cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(15): 7753-7766
- [27] Harrandah AM, Mora RA, Chan EKL. Emerging microRNAs in cancer diagnosis, progression, and immune surveillance [J]. *Cancer Lett*, 2018, 438: 126-132
- [28] Pasculli B, Barbano R, Fontana A, et al. Hsa-miR-155-5p Up-Regulation in Breast Cancer and Its Relevance for Treatment With Poly [ADP-Ribose] Polymerase 1 (PARP-1) Inhibitors [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1415
- [29] Catela Ivkovic T, Voss G, Cornella H, et al. microRNAs as cancer therapeutics: A step closer to clinical application [J]. *Cancer Lett*, 2017, 407: 113-122
- [30] Zeng Q, Tao X, Huang F, et al. Overexpression of miR-155 promotes the proliferation and invasion of oral squamous carcinoma cells by regulating BCL6/cyclin D2 [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37 (5): 1274-1280
- [31] Baba O, Hasegawa S, Nagai H, et al. MicroRNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis[J]. *J Oral Pathol Med*, 2016, 45(4): 248-255
- [32] Shi SS, Zhang HP, Yang CQ, et al. Exosomal miR-155-5p promotes proliferation and migration of gastric cancer cells by inhibiting TP53INP1 expression[J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(6): 152986
- [33] Xu W, Song C, Wang X, et al. Downregulation of miR-155-5p enhances the anti-tumor effect of cetuximab on triple-negative breast cancer cells via inducing cell apoptosis and pyroptosis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(1): 228-240
- [34] Liu B, Hu J, Zhao H, et al. MicroRNA-155-5p Contributes to 5-Fluorouracil Resistance Through Down-Regulating TP53INP1 in Oral Squamous Cell Carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 706095
- [35] Peyraud F, Italiano A. Combined PARP Inhibition and Immune Checkpoint Therapy in Solid Tumors [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12 (6): 1502
- [36] Michaille JJ, Awad H, Fortman EC, et al. miR-155 expression in anti-tumor immunity: The higher the better?[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019, 58(4): 208-218