

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.05.010

帕瑞昔布经 miR-152/ERBB3 信号通路对卵巢癌 Skov3 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用

王志君¹, 仇 玮²

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇四医院妇产科, 江苏 无锡 214144; 2. 南京医科大学第一附属医院 肿瘤病理科, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 探讨帕瑞昔布经 miR-152/表皮生长因子受体 3(ERBB3)信号通路对卵巢癌 Skov3 细胞增殖的抑制和凋亡诱导作用。方法 体外培养 Skov3 细胞, 阴性对照组加入无血清 DMEM 培养基, 帕瑞昔布低、中、高剂量组分别加入终浓度为 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的帕瑞昔布, 阳性对照组加入含有终浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$ 的顺铂, 48 h 后以四唑蓝(MTT)比色法检测 Skov3 细胞增殖情况, 以流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 同时以实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 Skov3 细胞中 miR-152, ERBB3, 以及环氧合酶 2(COX-2)、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)信使核糖核酸(mRNA)水平。结果 与阴性对照组相比, 帕瑞昔布低、中、高剂量组和阳性对照组 Skov3 细胞增殖率均显著降低, Skov3 细胞凋亡率均显著增加($P < 0.05$); 其 miR-152, ERBB3, COX-2, PI3K, Bcl-2 mRNA 水平均显著降低, Bax 和 Caspase-3 mRNA 水平均显著升高($P < 0.05$)。且帕瑞昔布低、中、高剂量组上述指标变化均呈剂量依赖性($P < 0.05$); 与帕瑞昔布高、中、低剂量组相比, 阳性对照组上述指标变化更明显($P < 0.05$)。结论 帕瑞昔布可能通过抑制 miR-152/ERBB3 信号通路, 从而抑制 Skov3 细胞增殖和诱导其凋亡。

关键词:帕瑞昔布; miR-152/表皮生长因子受体 3 信号通路; 卵巢癌; Skov3 细胞株; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R965; R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)05-0037-05

Effect of Parecoxib on Proliferation Inhibition and Apoptosis Induction of Ovarian Cancer Skov3 Cells via the miR-152/ERBB3 Signaling Pathway

WANG Zhijun¹, QIU Wei²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The 904th Hospital of PLA Joint Service Support Force, Wuxi, Jiangsu, China 214144; 2. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, China 210029)

Abstract: Objective To investigate the effect of parecoxib on proliferation inhibition and apoptosis induction of ovarian cancer Skov3 cells via the miR-152/ERBB3 signaling pathway. **Methods** Skov3 cells were cultured *in vitro*, and serum-free DMEM medium was added to the negative control group, parecoxib with final concentrations of 50, 100, and 200 $\mu\text{mol/L}$ was added to the low-dose, medium-dose and high-dose parecoxib groups, respectively, while cisplatin with final concentration of 4 $\mu\text{mol/L}$ was added to the positive control group. After 48 h, the proliferation of Skov3 cells were detected by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay, the apoptosis of Skov3 cells were detected by flow cytometry, and the levels of miR-152, ERBB3, cyclooxygenase-2(COX-2), phosphatidylinositol 3 kinase(PI3K), B cell lymphoma/leukemia-2(Bcl-2), Bcl-2 associated X protein(Bax) and Caspase-3 mRNA in Skov3 cells were detected by RT-PCR method. **Results** Compared with those in the negative control group, the proliferation rate of Skov3 cells was significantly decreased, and the apoptosis rate of Skov3 cells was significantly increased($P < 0.05$), the levels of miR-152, ERBB3, COX-2, PI3K and BCL-2 mRNA in Skov3 cells were significantly decreased, the levels of Bax and Caspase-3 mRNA in Skov3 cells were significantly increased in low-dose, medium-dose and high-dose parecoxib groups and positive control group($P < 0.05$), and the effect was dose-dependent in low-dose, medium-dose and high-dose parecoxib groups($P < 0.05$). Compared with those in low-dose, medium-dose and high-dose parecoxib groups, the changes of the above indexes in the positive control group were more obvious($P < 0.05$). **Conclusion** Parecoxib can inhibit the proliferation of Skov3 cells and induce the apoptosis of Skov3 cells by inhibiting the miR-152/ERBB3 signaling pathway.

Key words: parecoxib; miR-152/ERBB3 signaling pathway; ovarian cancer; Skov3 cells; cell proliferation; apoptosis

卵巢癌(OC)为妇科常见的恶性肿瘤, 目前的标准治疗为手术加铂类和紫杉烷类辅助化学治疗(简称化疗)^[1]。虽然许多上皮性卵巢癌患者初治时有良好反应, 但复发率较高, 生存率低于 50%^[2]。研究表明, 卵巢癌和胶质母细胞瘤中存在环氧合酶 2(COX-2)的过表

达, 同时炎症与肿瘤的发生有关, COX-2 参与炎症的调控^[3-4], 故抑制 COX-2 可能表现出潜在的抗癌作用。帕瑞昔布为新型 COX-2 选择性抑制剂, 常用于术后镇痛, 不良反应发生率低, 且对大肠癌和食道腺癌等有治疗作用^[5]。microRNA(miR)是一类高度保守的非编

码 RNA, miRNA 的异常表达与癌变密切相关,在细胞分化、增殖、凋亡、致癌等过程中起关键作用。miR-152 是卵巢癌潜在的预后标志物,在卵巢癌组织中低表达^[6]。表皮生长因子受体 3(ERBB3)是 miR-152 的靶基因^[7],尚不清楚帕瑞昔布经 miR-152/ERBB3 信号通路对卵巢癌的抗癌作用。本研究中探讨了帕瑞昔布经 miR-152/ERBB3 信号通路对卵巢癌 Skov3 细胞的增殖和凋亡作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂:帕瑞昔布(美国 Sigma 公司,批号为 QP182400);卵巢癌 Skov3 细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库,批号为 5173);胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号为 PM190040);DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司,批号为 31600-034);四噻唑蓝(MTT,美国 Amresco 公司,批号为 0793);AnnexinV/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司,批号为 CA1020);Trizol(美国 Invitrogen 公司,批号为 15596026);Prime Script RT reagent Kit Perfect Real Time RNA 反转录试剂盒(批号为 HS0148),Ultra SYBR One Step RNA 聚合酶链式反应(PCR) Kit 荧光定量 PCR 试剂盒(批号为 HS0614),均购于宝生物工程(大连)有限公司。miR-152, ERBB3, COX-2, 以及磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)、U6 引物,均由大连 TaKaRa 公司设计并合成。miR-152 上游引物为 5'-TCAGTGCATGACAGAACTTGGAA-3',下游引物为 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGT-3';ERBB3 上游引物为 5'-GCAGATCACTGTGTAGCGTG-3',下游引物为 5'-CGTGTGCAGTTGAAGTGACA-3';COX-2 上游引物为 5'-GGGAGGATTGTGGCCTTCTT-3',下游引物为 5'-TGTGCAGGTGCCGTTTCAG-3';PI3K 上游引物为 5'-ATCATGGGCTGGACATTGGA-3',下游引物为 5'-ACAGGGACATCAGTCGCTTCA-3';Bcl-2 上游引物为 5'-GGGAGGATTGTGGCCTTCTT-3',下游引物为 5'-TGTGCAGGTGCCGTTTCAG-3';Bax 上游引物为 5'-ATCATGGGCTGGACATTGGA-3',下游引物为 5'-ACAGGGACATCAGTCGCTTCA-3';Caspase-3 上游引物为 5'-GACTCTGGAATATCCCTGGACAACA-3',下游引物为 5'-AGGTTTGCTGCATCGACATCTG-3';U6 引物序列上游引物为 5'-GCTTCGGCAGCACATATAC-TAAAAT-3',下游引物为 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'。

仪器:Elite 系列二氧化碳细胞培养箱(美国赛默飞

世尔科技有限公司);1-14K 型高速低温离心机(美国 Sigma 公司);HBS-1096B 型酶标仪(南京德铁实验设备有限公司);奥林巴斯 CX43 型显微镜(日本奥林巴斯公司);NanoDrop 2000c 型蛋白核酸检测仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);BDFACSCanto 型流式细胞仪,CFX96 型实时荧光定量 PCR,均购自美国 BIO-RAD 公司。

1.2 细胞培养及分组

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 37℃ 及 5% CO₂ 条件下培养 Skov3 细胞,当细胞处于对数生长期时进行试验,分为阴性对照组,帕瑞昔布低、中、高剂量组和阳性对照组。阴性对照组加入无血清 DMEM 培养基,帕瑞昔布低、中、高剂量组分别加入终浓度为 50, 100, 200 μmol/L 的帕瑞昔布^[8],阳性对照组加入含有终浓度为 4 μmol/L 的顺铂^[9],继续培养 48 h 后进行相关检测。

1.3 MTT 法测定 Skov3 细胞增殖

以 5×10³ 个/孔将细胞接种于 96 孔板中(每孔 200 μL),待细胞融合后,按 1.2 项下方法进行干预。试验结束前 4 h 加入 MTT(每孔 20 μL),继续培养,再加入 100 μL 二甲基亚砷振荡 10 min,摇匀,用酶标仪在 630 nm 波长处测定吸光度值,根据公式[细胞增殖率(%) = OD_{试验组} / OD_{对照组}]计算细胞增殖率。

1.4 流式细胞术检测 Skov3 细胞凋亡

以 5×10⁴ 个/孔将细胞接种于 6 孔板内(每孔 3 mL),按 1.2 项下方法操作,给予受试物干预 48 h 后转移至离心管内,离心,弃上清液,用 1×Bindingbuffer 调整细胞密度为 1×10⁶ 个/mL,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.5 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 Skov3 细胞中各指标水平

以 5×10⁴ 个/孔将细胞接种于 6 孔板内(每孔 3 mL),按 1.2 项下方法操作,给予受试物干预 48 h,使用 Trizol 从培养的细胞中提取总 RNA,根据反转录试剂盒说明书将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA,制备 20 μL 反应体系进行扩增。反应条件:预变性 94℃、30 s,变性 95℃、5 s,60℃、45 s,38 个循环,61℃ 时采集荧光,用实时荧光定量 PCR 仪检测,并对其表达量进行分析,以 U6 作为内参,采用 2^{-△△Ct} 法计算 miR-152, ERBB3, COX-2, PI3K, Bcl-2, Bax, Caspase-3 mRNA 的相对表达量。

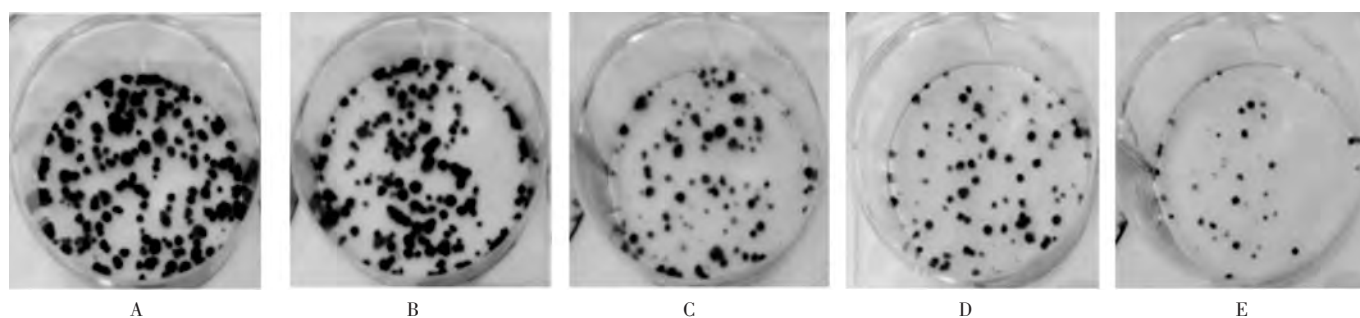
1.6 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计学软件分析。计量资料采用 $\bar{X} \pm s$ 表示,用单因素方差分析进行判断,组间比较用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 Skov3 细胞增殖和凋亡的影响

与阴性对照组比较,帕瑞昔布低、中、高剂量组和阳

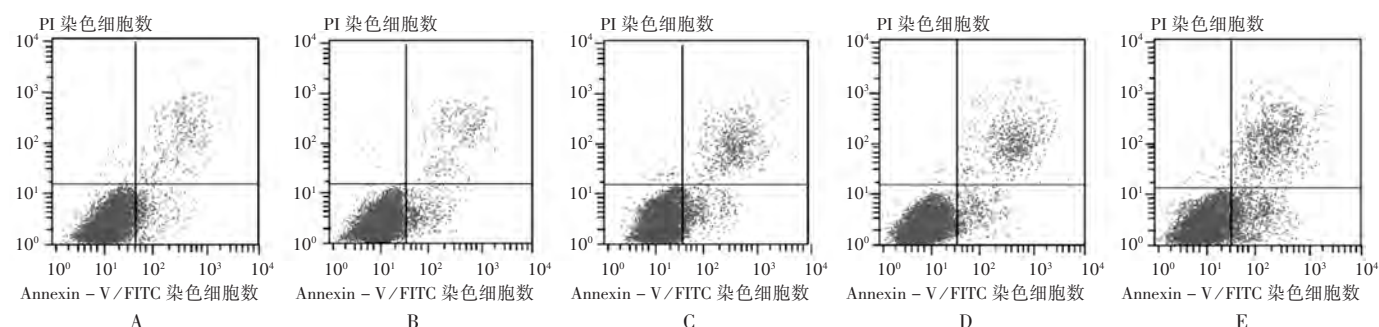


A. 阴性对照组 B. 帕瑞昔布低剂量组 C. 帕瑞昔布中剂量组 D. 帕瑞昔布高剂量组 E. 阳性对照组

图1 帕瑞昔布对 Skov3 细胞增殖的影响 (×200)

A. Negative control group B. Low-dose parecoxib group C. Medium-dose parecoxib group D. High-dose parecoxib group
E. Postive control group

Fig.1 Effect of parecoxib on the proliferation of Skov3 cells (×200)



A. 阴性对照组 B. 帕瑞昔布低剂量组 C. 帕瑞昔布中剂量组 D. 帕瑞昔布高剂量组 E. 阳性对照组

图2 帕瑞昔布对 Skov3 细胞凋亡的影响

A. Negative control group B. Low-dose parecoxib group C. Medium-dose parecoxib group D. High-dose parecoxib group
E. Postive control group

Fig.2 Effect of parecoxib on the apoptosis of Skov3 cells

表1 帕瑞昔布对 Skov3 细胞增殖和凋亡的影响 ($\bar{X} \pm s, \%$)

Tab.1 Effect of parecoxib on the proliferation and apoptosis of Skov3 cells ($\bar{X} \pm s, \%$)

组别	细胞增殖率	细胞凋亡率
阴性对照组	100.00 ± 8.42	0.16 ± 0.03
帕瑞昔布 低剂量组	83.28 ± 10.08 ^a	0.47 ± 0.09 ^a
中剂量组	67.13 ± 8.45 ^{ab}	1.69 ± 0.36 ^{ab}
高剂量组	56.73 ± 3.48 ^{abc}	2.44 ± 0.23 ^{abc}
阳性对照组	46.28 ± 7.15 ^{abcd}	3.20 ± 0.48 ^{abcd}

注:与阴性对照组比较,^a $P < 0.05$;与帕瑞昔布低剂量组比较,^b $P < 0.05$;与帕瑞昔布中剂量组比较,^c $P < 0.05$;与帕瑞昔布高剂量组比较,^d $P < 0.05$ 。下表同。

Note: Compared with those in the negative control group, ^a $P < 0.05$; compared with those in the low-dose parecoxib group, ^b $P < 0.05$; compared with those in the medium-dose parecoxib group, ^c $P < 0.05$; compared with those in the high-dose parecoxib group, ^d $P < 0.05$; as well as the following tables.

性对照组的细胞增殖率均显著降低,细胞凋亡率均显著增加,帕瑞昔布高、中、低剂量组的细胞增殖率和凋亡率均呈剂量依赖性($P < 0.05$);与阳性对照组比较,帕

表2 帕瑞昔布对 Skov3 细胞中 miR-152, ERBB3, COX-2, PI3K mRNA 水平的影响 ($\bar{X} \pm s$)

Tab.2 Effect of parecoxib on the levels of miR-152, ERBB3, COX-2 and PI3K mRNA in Skov3 cells ($\bar{X} \pm s$)

组别	miR-152	ERBB3	COX-2	PI3K
阴性对照组	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.20
帕瑞昔布 低剂量组	0.76 ± 0.05 ^a	0.82 ± 0.14 ^a	0.81 ± 0.05 ^a	0.74 ± 0.15 ^a
中剂量组	0.58 ± 0.04 ^{ab}	0.55 ± 0.07 ^{ab}	0.65 ± 0.05 ^{ab}	0.60 ± 0.02 ^{ab}
高剂量组	0.43 ± 0.09 ^{abc}	0.36 ± 0.10 ^{abc}	0.47 ± 0.10 ^{abc}	0.42 ± 0.10 ^{abc}
阳性对照组	0.28 ± 0.07 ^{abcd}	0.13 ± 0.02 ^{abcd}	0.24 ± 0.05 ^{abcd}	0.32 ± 0.05 ^{abcd}

瑞昔布低、中、高剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表1、图1和图2。

2.2 对 Skov3 细胞中 miR-152, ERBB3, COX-2, PI3K mRNA 水平的影响

与阴性对照组比较,帕瑞昔布低、中、高剂量组和阳性对照组细胞中 miR-152, ERBB3, COX-2 和 PI3K mRNA 水平均显著降低,帕瑞昔布高、中、低剂量组呈剂量依赖性($P < 0.05$);与阳性对照组比较,帕瑞昔布低、中、高剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$)。

详见表2。

2.3 对 Skov3 细胞中 Bcl-2, Bax, Caspase-3 mRNA 水平的影响

与阴性对照组比较,帕瑞昔布低、中、高剂量组和阳性对照组细胞中 Bcl-2 mRNA 水平均显著降低,Bax 和 Caspase-3 mRNA 水平均显著升高,帕瑞昔布高、中、低剂量组呈剂量依赖性($P < 0.05$);与阳性对照组比较,帕瑞昔布高、中、低剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表3。

表3 帕瑞昔布对 Skov3 细胞中 Bcl-2, Bax, Caspase-3 mRNA 水平的影响($\bar{X} \pm s$)

Tab.3 Effect of parecoxib on the levels of Bcl-2, Bax and Caspase-3 mRNA in Skov3 cells($\bar{X} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax	Caspase-3
阴性对照组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.02
帕瑞昔布 低剂量组	0.81 ± 0.26 ^a	1.28 ± 0.06 ^a	1.44 ± 0.64 ^a
中剂量组	0.73 ± 0.04 ^{ab}	1.53 ± 0.08 ^{ab}	1.69 ± 0.35 ^{ab}
高剂量组	0.57 ± 0.09 ^{abc}	1.94 ± 0.29 ^{abc}	1.97 ± 0.12 ^{abc}
阳性对照组	0.40 ± 0.10 ^{abcd}	2.60 ± 0.42 ^{abcd}	2.53 ± 0.46 ^{abcd}

3 讨论

目前,卵巢癌最好的治疗方法是手术结合顺铂联合紫杉醇化疗,但长期应用易产生耐药,临床疗效越来越差^[10]。COX-2 参与肿瘤的发生,COX-2 抑制剂表现出强大的抗癌作用。帕瑞昔布为新型 COX-2 选择性抑制剂,具有良好的抗炎镇痛作用^[11]。此外,帕瑞昔布可减少家族性腺瘤癌模型小鼠的息肉数量,并使经偶氮甲烷处理的大鼠胃癌的发生率降低 50% ~ 84%^[12-13]。本研究结果表明,帕瑞昔布能抑制 Skov3 细胞的增殖,同时诱导 Skov3 细胞的凋亡。虽然帕瑞昔布抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用不如顺铂强,但其毒副作用小,上述抗癌作用可能是通过抑制 miR-152/ERBB3 信号通路来调节的,具有研究价值。

miR 参与机体大部分复杂的生物学过程,尤其是肿瘤的发生和发展。miR-152 可作为肿瘤抑制剂在许多肿瘤的发生与发展、细胞增殖和凋亡中发挥重要作用。miR-152 在卵巢癌中高表达,在高转移性卵巢癌中这种高表达更明显^[14]。miR-152 和 miR-185 的联合作用通过靶向调控 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1),在卵巢癌的治疗中起着重要作用^[15]。体外试验发现,低表达 miR-152 可抑制卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭,诱导卵巢癌细胞凋亡^[16]。本研究中,帕瑞昔布可下调 miR-152 在 Skov3 细胞中的表达。同时,miR-152 调控 Skov3 细胞增殖和凋亡的作用可能是通过靶基因 ERBB3 来实现。

ERBB3 是 ERBB 家族的 4 个成员之一,可将细胞外信号转入细胞内,导致多种癌细胞增殖、存活、凋亡、迁移、侵袭等调控过程发生变化,参与黑色素瘤、乳腺

癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌等多种肿瘤的生理病理通路调控^[17]。ERBB3 可能激活下游的 COX-2 和 PI3K,与肿瘤发生和治疗耐药相关^[18]。COX-2 和 PI3K 被认为在肿瘤细胞增殖、转移和凋亡过程中起重要作用,在卵巢癌中已观察到 COX-2 和 PI3K 的过表达^[19]。越来越多的研究表明,ERBB3 是潜在的癌症治疗靶向标志物。ERBB3 通过 PI3K/蛋白激酶(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路对细胞凋亡进行调控。Bcl-2 家族参与了细胞凋亡的调控,Bcl-2 是主要的抗凋亡蛋白,Bax 是促凋亡蛋白,接受上游的刺激信号,启动线粒体凋亡程序,通过一系列调控,最终激活 Caspase-3,而 Caspase-3 是细胞凋亡的启动因子,使细胞进入凋亡最终阶段^[20-21]。本研究结果显示,帕瑞昔布可同时抑制上游的 miR-152/ERBB3 信号通路,从而抑制 Skov3 细胞中 Bcl-2 mRNA 水平的表达,促进 Bax 和 Caspase-3 mRNA 水平的表达,同时诱导 Skov3 细胞的凋亡。

综上所述,帕瑞昔布可抑制 Skov3 细胞增殖,促进其凋亡,其作用机制可能与抑制 miR-152/ERBB3 信号通路有关。以上研究为今后临床抗癌药物的开发提供了试验依据,但目前尚不清楚是否有更多的信号通路介导帕瑞昔布的作用,仍需作进一步研究。

参考文献

- [1] SHI TY, WANG P, XIE CX, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in ovarian cancer patients from China: Ethnic-related mutations in BRCA1 associated with an increased risk of ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2017, 140(9): 2051-2059.
- [2] CONNOR EV, SAYGIN C, BRALEY C, et al. Thy-1 predicts poor prognosis and is associated with self-renewal in ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2019, 12(1): 112.
- [3] CAO HH, WANG Q, GAO ZY, et al. Clinical value of detecting IQGAP3, B7-H4 and cyclooxygenase-2 in the diagnosis and prognostic evaluation of colorectal cancer[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19(1): 163.
- [4] DESAI SJ, PRICKRIL B, RASOOLY A. Mechanisms of Phytonutrient Modulation of Cyclooxygenase-2(COX-2) and Inflammation Related to Cancer[J]. Nutr Cancer, 2018, 70(3): 350-375.
- [5] 梅莉, 方莹莹. 帕瑞昔布减轻大鼠全脑缺血所致海马 CA1 区神经元损伤[J]. 临床麻醉学杂志, 2018, 34(8): 805-808.
- [6] LIU WW, ZHANG LX, WANG J, et al. Analysis of the inhibitory effects of miR-124 and miR-152 on human epithelial ovarian cancer xenografts in a nude mouse model[J]. Oncol Lett, 2019, 17(1): 348-354.
- [7] LI LW, XIAO HQ, MA R, et al. miR-152 is involved in the proliferation and metastasis of ovarian cancer through repression of ERBB3[J]. Int J Mol Med, 2017, 41(3): 1529-1535.
- [8] LI LY, XIAO J, LIU Q, et al. Parecoxib inhibits glioblastoma cell proliferation, migration and invasion by up-regulating miRNA-29c[J]. Biol Open, 2017, 6(3): 311-316.
- [9] 徐里, 赵川, 张延武. 金丝桃苷对卵巢癌细胞增殖、凋