



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2021.05.08

文章编号: 2095-1264(2021)05-0561-09

lncRNA PVT1 通过 miR-1207-5p 靶向调控 Wnt6/ β -catenin2 信号通路对高级别浆液性卵巢癌的影响

姚 艳¹, 黄秀敏¹, 刘争进²

(厦门大学附属中山医院/福建医科大学附属教学医院¹妇产科; ²病理科, 福建 厦门, 361004)

摘要: **目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)PVT1 对高级别浆液性卵巢癌增殖和迁移能力的影响。**方法** 收集 61 例高级别浆液性卵巢癌患者的癌组织及相应癌旁正常组织, qRT-PCR 检测 miR-1207-5p、lncRNA PVT1 在高级别浆液性卵巢癌组织、癌旁正常组织及不同细胞系中的表达情况。构建 lncRNA PVT1 沉默细胞系, 分为 Ovar3-siPVT1 组、Ovar3-siNC 组、NC 组。采用 MTT 和平板克隆实验、Transwell 和划痕实验检测细胞增殖、侵袭和迁移; 双荧光素酶报告基因检测验证 miR-1207-5p 与 lncRNA PVT1、Wnt6 的靶向关系, StarBase 和 TargetScan 网站预测相应 miRNA 可靶向结合的基因; Western blotting 检测 Wnt6/ β -catenin2 信号通路相关蛋白的表达。构建 siPVT1+过表达 miR-1207-5p、siPVT1+过表达 Wnt6 细胞系, 以 siPVT1+siNC 为对照, 验证 lncRNA PVT1 的调控作用。**结果** qRT-PCR 结果显示, 高级别浆液性卵巢癌组织中 lncRNA PVT1 的表达水平显著高于正常癌旁组织 ($P<0.05$)。与 NC 组和 Ovar3-siNC 组相比, Ovar3-siPVT1 组中 lncRNA PVT1 的表达显著下调, 细胞克隆数、侵袭数减少, 细胞迁移率降低, Wnt6/ β -catenin2 蛋白表达水平明显下降, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因检测结果证明 miR-1207-5p 与 lncRNA PVT1、Wnt6 具有靶向关系。经 StarBase 和 TargetScan 网站预测分析, miR-1207-5p 分别与 lncRNA PVT1、Wnt6 存在靶向结合位点。与 siPVT1+NC 组相比, siPVT1+过表达 miR-1207-5p 组和 siPVT1+过表达 Wnt6 组细胞克隆数和迁移数明显增加 ($P<0.05$)。**结论** lncRNA PVT1 在高级别浆液性卵巢癌中高表达。高表达 lncRNA PVT1 可能通过上调 miR-1207-5p 表达增强 Wnt6/ β -catenin2 信号通路的活性, 从而促进高级别浆液性卵巢癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

关键词: lncRNA PVT1; miR-1207-5p; 高级别浆液性卵巢癌; Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A

Effects of lncRNA PVT1 on high-level serous ovarian cancer by targeting the Wnt6/ β -catenin2 signaling pathway through miR-1207-5p

YAO Yan¹, HUANG Xiumin¹, LIU Zhengjin²

(¹ Department of Obstetrics and Gynecology, ² Department of Pathology, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University / the Affiliated Teaching Hospital of Fujian Medical University, Xiamen, Fujian, 361004, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of long non-coding RNA PTV1 (lncRNA PTV1) on the proliferation and migration of high-grade serous ovarian cancer. **Methods** The expression of miR-1207-5p and lncRNA PVT1 was detected by qRT-PCR in 61 cases of high-grade serous ovarian cancer tissues and the corresponding normal tissues. The lncRNA PVT1-silenced cell lines were constructed and divided into Ovar3-siPVT1, Ovar3-siNC and NC groups. The MTT and plate cloning experiment, Transwell and scratch test were used to detect the proliferation, invasion and migration of cancer cells. The dual luciferase reporter gene detection was used to verify the targeting relationship of miR-1207-5p with lncRNA PVT1 and Wnt6. StarBase and TargetScan website was retrieved to predict the target binding sites of the correspond-

作者简介: 姚艳, 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 妇科肿瘤。

*通信作者: 黄秀敏, 女, 硕士, 主任医师, 研究方向: 妇科肿瘤。

ing miRNA. Western blotting was used to detect the expression of proteins of Wnt6/ β -catenin2 signaling pathway. The cell lines of siPVT1 + overexpressed miR-1207-5p and siPVT1 + overexpressed Wnt6 were constructed to verify the regulatory effect of lncRNA PVT1 by using siPVT1 + siNC cells as control. **Results** The results of qRT-PCR showed that the expression level of lncRNA PVT1 was significantly higher in advanced serous ovarian cancer tissue than in the normal adjacent tissue ($P < 0.05$). Compared with the NC group and Ovar3-siNC group, the Ovar3-siPVT1 group showed down-regulated expression of lncRNA PVT1, reduced number of cell cloning and invading, and lowered cell migration rate, as well as significantly decreased expression of Wnt6 and β -catenin2 proteins ($P < 0.05$). Results of dual luciferase reporter gene detection showed that miR-1207-5p had a targeting relationship with lncRNA PVT1 and Wnt6. The StartBase and TargetScan prediction analysis also showed that miR-1207-5p had target binding sites to lncRNA PVT1 and Wnt6 respectively. Compared with siPVT1 + NC group, the number of cell cloning and migration was increased significantly in siPVT1 + overexpressed miR-1207-5p group and siPVT1+overexpressed Wnt6 group ($P < 0.05$). **Conclusion** lncRNA PVT1 had high expression in high-grade serous ovarian cancer. The highly expressed lncRNA PVT1 may enhance the Wnt6/ β -catenin2 signaling pathway by down-regulating the expression of miR-1207-5p, and hereby promote the proliferation and metastasis of high-grade serous ovarian cancer cells.

Keywords: lncRNA PVT1; miR-1207-5p; High-grade serous ovarian cancer; Wnt/ β -catenin signaling pathway

前言

高级别浆液性卵巢癌是临床最常见的女性生殖系统恶性肿瘤之一,在上皮性卵巢癌中占大多数,且发病迅速、转移率高,严重危害女性健康^[1]。高级别浆液性卵巢癌早期症状不明显,患者就诊时往往已处于晚期^[2]。目前,治疗高级别浆液性卵巢癌的主要手段是手术及术后化疗,虽然患者5年存活率达40%以上,但由于易复发和转移,导致晚期预后效果差^[3],因此,寻找新的治疗靶点尤为迫切。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类不编码蛋白质的功能性RNA分子,转录本长度超过200 nt^[4],并在所有非编码基因中占相当大的比重。近期研究^[5]表明,lncRNA在肿瘤细胞增殖、侵袭、转移等过程中起着重要的调节作用。PVT1是一种在肿瘤细胞中特异性高表达的lncRNA。研究发现,PVT1异常表达与多种恶性肿瘤的发生相关,并证实其可促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[6]。目前,关于PVT1在高级别浆液性卵巢癌中的作用研究报道甚少。本研究拟通过对高级别浆液性卵巢癌组织和细胞株进行研究,探讨PVT1对高级别浆液性卵巢癌细胞增殖和迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 临床样本 收集2008年7月—2018年7月于我院接受高级别浆液性卵巢癌手术切除的80例患者的癌组织及距癌组织边缘>2 cm处的正常组织,并构建组织芯片。免疫组织化学染色发现19例样本存在一定程度的缺失,其余61例样本经病理检查

确诊为高级别浆液性卵巢癌。所有患者术前均未接受化疗或放疗。本研究经我院伦理委员会审核批准,所有患者均签署知情同意书。

1.2 细胞及主要试剂和仪器 人正常卵巢表层上皮细胞HOSEpiC,人源卵巢癌细胞株Ovar3、SKOV3、COC1、A2780均购自美国模式培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC);构建PVT1沉默慢病毒载体Lv-siPVT1、Lv-miR-1207-5p和Lv-Wnt6过表达慢病毒载体,miR-1207-5p与PVT1 Real-Time qPCR引物均由上海吉玛制药技术有限公司设计完成。DMEM培养基、qRT-PCR购自美国Applied Biosystems公司;检测试剂盒(QPK-201)购自日本TOYOBO公司;TRIzol Reagent、Transwell小室均购自Thermo Fisher Scientific公司;MTT试剂盒购自MSKBIO公司;Wnt6一抗(批号:LZ39877491)、 β -catenin2一抗(批号:AB39487472)购自日本TAKARA公司。超净工作台购自上海智城分析仪器制造有限公司;细胞培养箱购自北京中兴伟业仪器有限公司;倒置荧光显微镜购自MicroDemo公司。

1.3 细胞转染 取2 mL浓度为 1×10^6 个/mL的Ovar3细胞接种至6孔板,培养过夜。以未转染细胞作为空白对照组(NC组),将siPVT1和阴性对照siNC转染至细胞,得到Ovar3-siPVT1组及Ovar3-siNC组细胞。将过表达miR-1207-5p、过表达Wnt6及空载慢病毒载体转染至Ovar3-siPVT1细胞,得到siPVT1+过表达miR-1207-5p组、siPVT1+过表达Wnt6组及siPVT1+siNC组细胞。

1.4 qRT-PCR检测lncRNA PVT1的表达 利用

TRIzol 法提取各组细胞的总 mRNA, 并采用 Prime-Script 反转录试剂盒反转录成 cDNA, 所有操作严格按照试剂盒说明书执行。采用 SYBR Premix Ex Taq 配置 PCR 反应体系, 反应条件: 75 ℃、120 s 预变性, 90 ℃、5 min 变性, 60 ℃、60 s 退火, 72 ℃、30 s 延伸, 40 个循环, PCR 仪采集荧光信号。以 U6 为内参(上游引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 下游引物为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'), PVT1 (上游引物为 5'-GTCTCCCTATGGAATGTAAG-3', 下游引物为 5'-AGTGTCTTGGCAGTAAAAG-3') 和 miR-1207-5p (上游引物为 5'-ACTGTCTCCCAACCCTTGTA-3', 下游引物为 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3') 的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。每个样本独立重复实验 3 次。

1.5 MTT 及平板克隆实验检测细胞增殖 将细胞株按照每孔 500~1000 个铺至 96 孔板, 设 24、48、72、96 h 四个时间点, 每个时间点设 5 个复孔, 轻轻混匀后, 置于 37 ℃ 培养箱培养。于设定时间点取出 96 孔板, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液, 37 ℃ 避光 4 h, 弃上清, 加入 100 μ L DMSO, 置于 37 ℃ 摇床上快速振荡 15 min 充分溶解结晶, 酶标仪检测 492 nm 处 OD 值。

1.6 Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移 迁移实验: 将 40 μ L Matrigel 胶用不含胎牛血清的 RPMI-1640 以 1:8 稀释, 水化, 铺在 Transwell 小室的上室底部, 细胞分组处理同上。消化细胞, 1 \times PBS 清洗 2 次, 用无血清 RPMI-1640 稀释至 1×10^5 个/mL。取 200 μ L 细胞悬液加入 Transwell 上室, 500 μ mol \cdot L⁻¹ 含 20% FBS 的 RPMI-1640 加入 Transwell 下室, 保证下层完全培养基与 Transwell 小室间无气泡, 将细胞置于培养箱培养 24 h。取出 Transwell 上室, 用预冷的 PBS 冲洗 2 次, 加入 500 μ L 用甲醇配制、PBS 稀释的 0.1% 结晶紫染液进行染色, 室温避光 15 min, PBS 漂洗, 用棉棒擦拭 Transwell 小室内部, 倒置晾干。倒置荧光显微镜下观察并拍照, 采用 Image-Pro Plus6.0 计数细胞。侵袭实验操作与迁移实验相同, 但不铺 Matrigel 胶。

1.7 划痕实验检测细胞迁移 将 Ovar3-siPVT1、Ovar3-siNC 及 NC 细胞按 5×10^5 个/孔接种至 6 孔板。以直尺辅助, 10 μ L 白枪头划线, 加入 PBS 冲洗细胞碎片, 然后加入含 1% 胎牛血清的培养基, 显微镜下拍照并标记, 置于 37 ℃、5% CO₂ 温箱培养。24 h 后, 倒置显微镜下观察细胞运动情况并拍照。

1.8 生物信息学预测和荧光素酶报告基因分析 通过检索生物信息学网站 StarBase 预测 miR-1207-

5p 与 PVT1 的靶向结合位点, TargetScan 预测 miR-1207-5p 与 Wnt6 的靶向结合位点。PCR 扩增 PVT1 和 Wnt6 的 3'-非翻译区序列, 构建至荧光素酶报告基因载体 psi-CHECK 中, 即野生型 lncRNA PVT1-wild 和 Wnt6-wild, 同时构建突变型重组质粒 lncRNA PVT1-mutant 和 Wnt6-mutant。将 HEK293T 细胞按 30% 左右的密度接种至 24 孔板, miR-1207-5p mimic、mimic control 分别与上述质粒共转染至 HEK293T 细胞。24 h 后, 按照双荧光素酶检测试剂盒说明书检测荧光素酶活性。

1.9 Western blotting 将转染 48 h 的 Ovar3 细胞加入适量 RIPA 裂解液裂解 30 min, 12 000 r \cdot min⁻¹、4 ℃ 离心 10 min, 收集上清。采用总蛋白提取试剂盒分别提取组织及细胞中的总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量。制备蛋白样品并进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后转至 PVDF 膜, 加入含 5% BSA 的封闭液室温封闭 2 h。分别加入适量用封闭液稀释的 Wnt6 多克隆抗体 (1:500)、 β -catenin2 多克隆抗体 (1:800), 4 ℃ 冰箱孵育过夜。次日, 用 PBST 洗膜, 分别加入用稀释的辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1:500), 室温孵育 2 h, PBST 洗膜, 加入 ECL 避光孵育 5 min, 暗室曝光拍照, 以 GAPDH 作为内参。

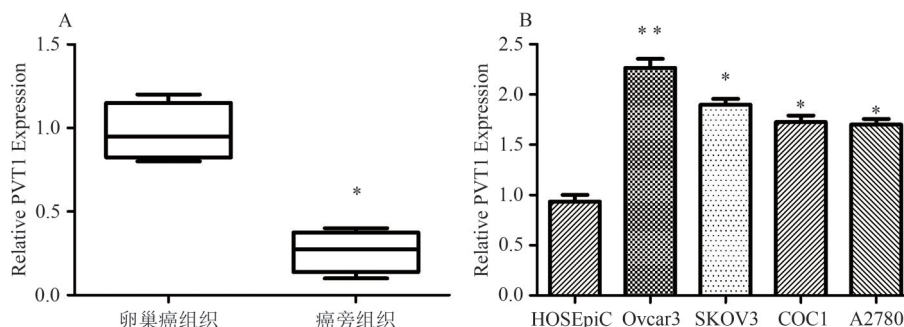
1.10 统计学分析 实验数据采用 R3.5.1 软件进行分析, 数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用独立样本 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PVT1 在不同组织和细胞系中的表达 PVT1 在高级别浆液性卵巢癌组织中的表达水平显著高于癌旁正常组织 ($P<0.05$)。PVT1 在卵巢癌细胞中的表达明显高于人正常卵巢上皮细胞 HOSEpiC, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。其中 Ovar3 细胞中 PVT1 表达水平最高, 与其他卵巢癌细胞相比, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 1)。因此, Ovar3 细胞更适合作为模式细胞进行后续研究。

2.2 细胞沉默结果验证 Ovar3-siPVT1 组细胞的 PVT1 表达水平显著低于 NC 组和 Ovar3-siNC 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。Ovar3-siNC 组细胞的 PVT1 表达水平与 NC 组无显著差异 ($P>0.05$), 表明 PVT1 沉默细胞和阴性转染细胞构建成功 (图 2)。

2.3 PVT1 对 Ovar3 细胞增殖的影响 与 NC 组和 Ovar3-siNC 组相比, PVT1 被沉默后, Ovar3-

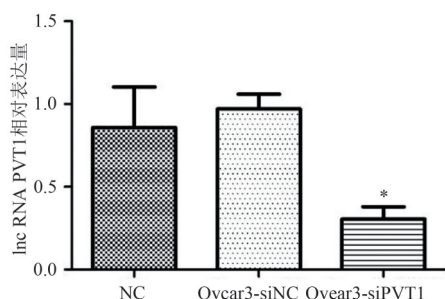


注:(A) PVT1在不同组织中的表达;(B) PVT1在正常卵巢上皮细胞和不同高级别浆液性卵巢癌细胞系中的表达。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Note: (A) Expression of PVT1 in different tissues; (B) Expression of PVT1 in normal ovarian cells and different high-grade serous ovarian cancer cell lines. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图1 PVT1在不同组织和不同细胞系中的表达

Fig. 1 Expression of PVT1 in different tissues and different cell lines



注:与NC组相比,* $P<0.05$ 。

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

图2 PVT1在各组细胞中的表达

Fig. 2 Expression of PVT1 in each group

siPVT1组 $OD_{492\text{ nm}}$ 显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。沉默PVT1后,Ovar3-siPVT1组细胞克隆数目显著减少($P<0.05$),而NC组和Ovar3-siNC组之间无显著差异($P>0.05$),提示沉默PVT1可显著降低卵巢癌细胞的增殖能力(图3)。

2.4 PVT1对Ovar3细胞侵袭和迁移的影响 相较

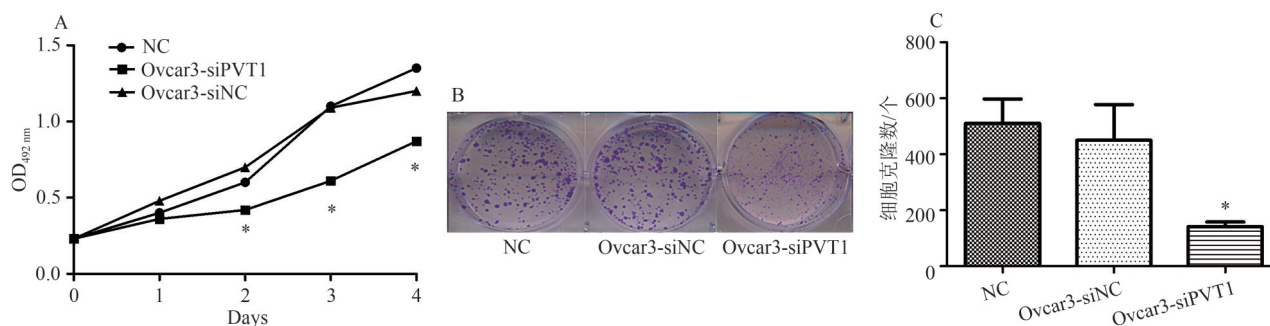
于NC组和Ovar3-siNC组,Ovar3-siPVT1组细胞侵袭数目明显减少,迁移率明显降低,差异有统计学意义($P>0.05$),而NC组和Ovar3-siNC组之间无显著差异($P>0.05$)(图4)。

2.5 生物信息学预测 miR-1207-5p 与 PVT1 的靶向关系

转染 miR-1207-5p 后,lncRNA PVT1-wild 的荧光素酶活性被抑制($P<0.05$),而 lncRNA PVT1-mutant 的荧光素酶活性无明显变化($P>0.05$),说明 miR-1207-5p 与 PVT1 具有靶向调控关系。StarBase 数据库预测结果显示,miR-1207-5p 与 PVT1 靶向结合(图5)。

2.6 miR-1207-5p 在不同组织及不同细胞系中的表达

miR-1207-5p 在高级别浆液性卵巢癌组织中的表达水平显著高于癌旁正常组织,且在卵巢癌细胞中的表达水平明显高于人正常卵巢上皮细胞 HOSEpiC,差异均有统计学意义($P<0.05$)。其中 Ovar3 细胞中 miR-1207-5p 的表达水平最高,与其他



注:(A) MTT检测细胞增殖;(B)平板克隆实验检测细胞增殖;(C)细胞平板克隆计数结果。与空白对照组相比,* $P<0.05$ 。

Note: (A) Proliferation of cells in each group detected by MTT; (B) Proliferation of cells detected by plate cloning experiment; (C) The plate cloning counting of each group. Compared with the NC group, * $P<0.05$.

图3 PVT1对高级别浆液性卵巢癌细胞增殖能力的影响

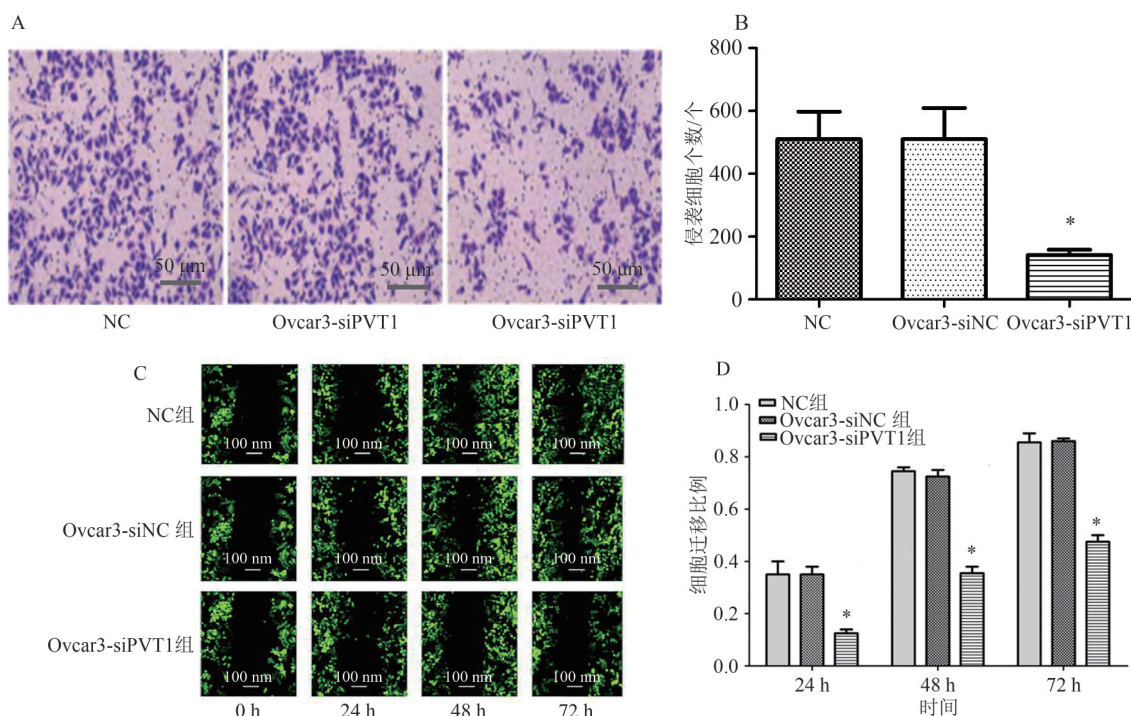
Fig. 3 Effects of PVT1 on proliferation of high-grade serous ovarian cancer cell lines

卵巢癌细胞系相比,差异有统计学意义($P<0.05$)(图6)。

2.7 生物信息学预测 miR-1207-5p 与 Wnt6 的靶向关系

转染 miR-1207-5p 后, Wnt6-wild 的荧光

素酶活性被抑制($P<0.05$),而 Wnt6-mutant 的荧光素酶活性无明显变化($P>0.05$),说明 miR-1207-5p 与 Wnt6 具有靶向调控关系。TargetScan 数据库预测结果显示,miR-1207-5p 与 Wnt6 靶向结合(图7)。

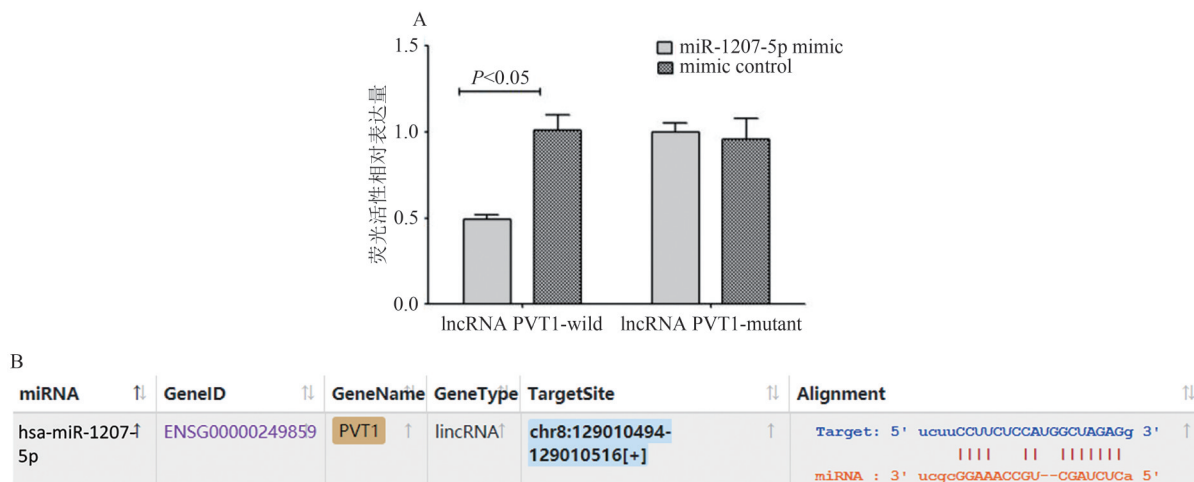


注:(A) Transwell 实验检测细胞侵袭;(B)侵袭细胞数目;(C)划痕实验检测细胞迁移;(D)细胞迁移率。与空白对照组相比,* $P<0.05$ 。

Note: (A) The invasion ability of Ovarcar3 cells detected by Transwell assay; (B) Number of invading cells; (C) The migration ability of Ovarcar3 cells detected by Scratch test; (D) The migration rate of cells. Compared with the NC group, * $P<0.05$.

图4 PVT1 对高级别浆液性卵巢癌细胞侵袭和迁移的影响

Fig. 4 Effects of PVT1 on the invasion and migration of high-grade serous ovarian cancer cell lines

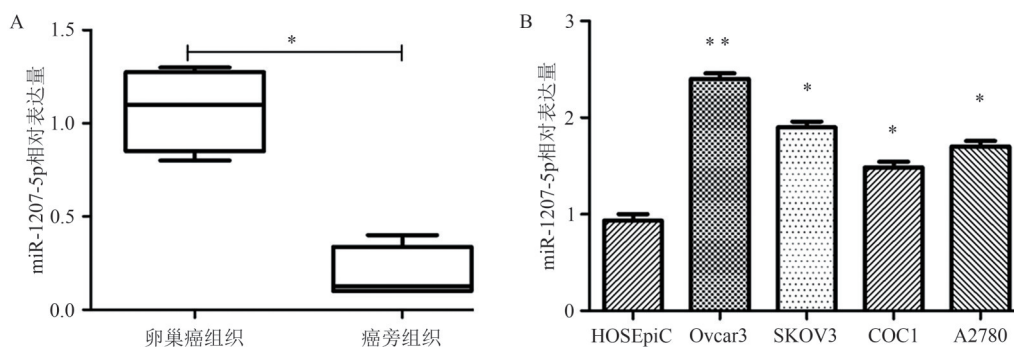


注:(A)双荧光素酶报告基因检测结果;(B)StarBase 预测 miR-1207-5p 与 PVT1 的靶向结合位点。

Note: (A) Results of dual luciferase reporter gene detection; (B) StarBase predicted the target binding sites of miR-1207-5p to lncRNA PVT1.

图5 生物信息学预测 miR-1207-5p 与 PVT1 的靶向关系

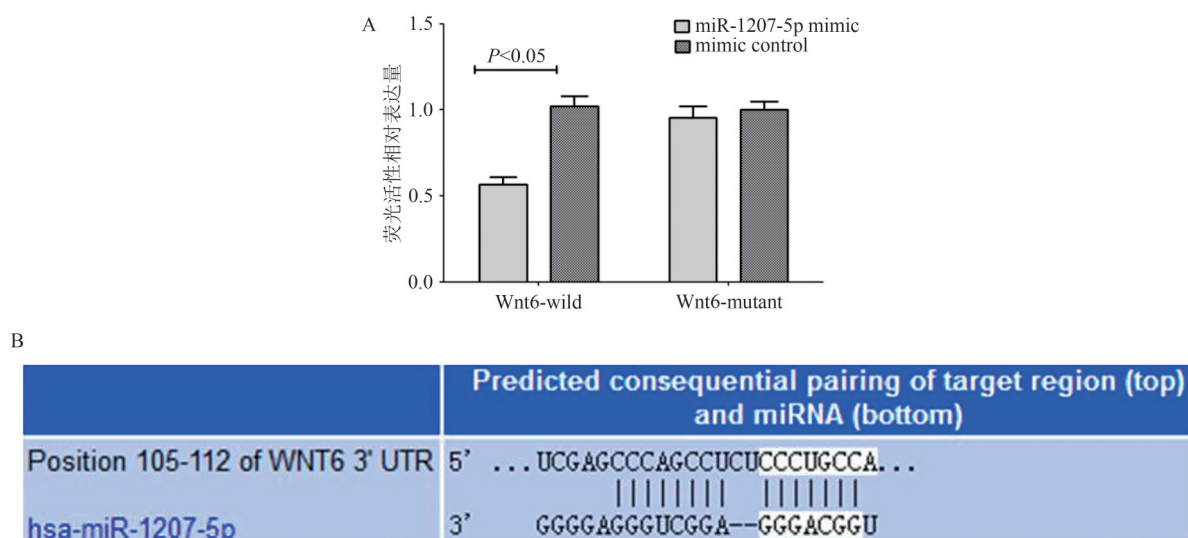
Fig. 5 Bioinformatics prediction of the targeting relationship between miR-1207-5p and PVT1



注:(A) miR-1207-5p 在不同组织中的表达;(B) miR-1207-5p 在正常卵巢上皮细胞和不同高级别浆液性卵巢癌细胞系中的表达。 $P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

Note: (A) Expression of miR-1207-5p in different tissues; (B) Expression of miR-1207-5p in normal ovarian epithelial cells and different high-grade serous ovarian cancer cell lines. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

图 6 miR-1207-5p 在不同组织和不同细胞系中的表达
Fig. 6 Expression of miR-1207-5p in different tissues and different cell lines



注:(A) 双荧光素酶报告基因检测结果;(B) TargetScan 预测 miR-1207-5p 与 Wnt6 的靶向结合位点。

Note: (A) Results of dual luciferase reporter gene detection; (B): TargetScan predicted the target binding sites of miR-1207-5p to Wnt6.

图 7 生物信息学预测 miR-1207-5p 与 Wnt6 的靶向关系
Fig. 7 Bioinformatics prediction of the targeting relationship between miR-1207-5p and Wnt6

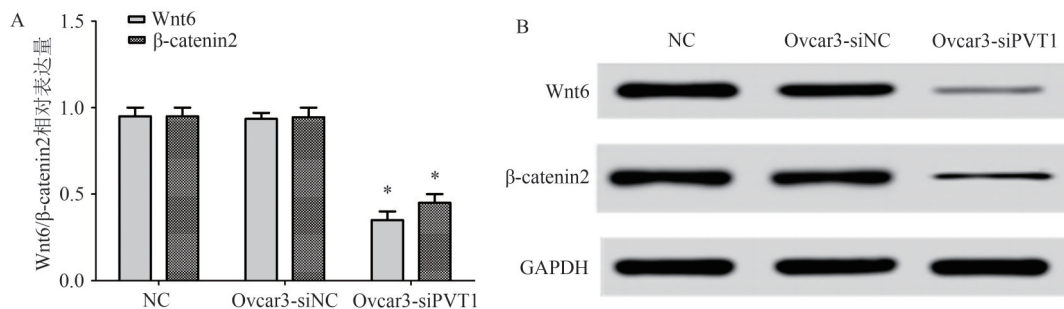
2.8 PVT1 与 Wnt6/ β -catenin2 的作用关系 Ovcar3-siPVT1 组细胞中 Wnt6/ β -catenin2 的表达水平明显低于 NC 组和 Ovcar3-siNC 组 ($P < 0.05$), 而 NC 组和 Ovcar3-siNC 组中 Wnt6/ β -catenin2 的表达水平无显著差异 ($P > 0.05$), 提示 PVT1 对 Wnt6/ β -catenin2 通路相关蛋白的表达具有促进作用(图 8)。

2.9 过表达 miR-1207-5p、Wnt6 验证 PVT1 对 Ovcar3 细胞的影响 与 siPVT1+siNC 组相比, siPVT1+过表达 miR-1207-5p 组和 siPVT1+过表达 Wnt6 组细胞克隆数和迁移数均明显增加 ($P < 0.05$), 说明过表达 miR-1207-5p 和 Wnt6 均可逆转 PVT1 沉默对

Ovcar3 细胞的影响(图 9)。

3 讨论

高级别浆液性卵巢癌是临床最常见的女性生殖系统恶性肿瘤之一, 对女性健康造成严重危害^[7]。高级别浆液性卵巢癌发病迅速且转移率高, 早期无典型症状, 患者就诊时往往已处于晚期^[8]。目前, 治疗高级别浆液性卵巢癌的主要手段是手术及术后化疗, 但由于其易复发和转移的特性, 导致晚期预后效果差^[9]。因此, 从分子生物学角度出发寻找新的治疗靶点尤为迫切, 对于患者选择合适的治疗方

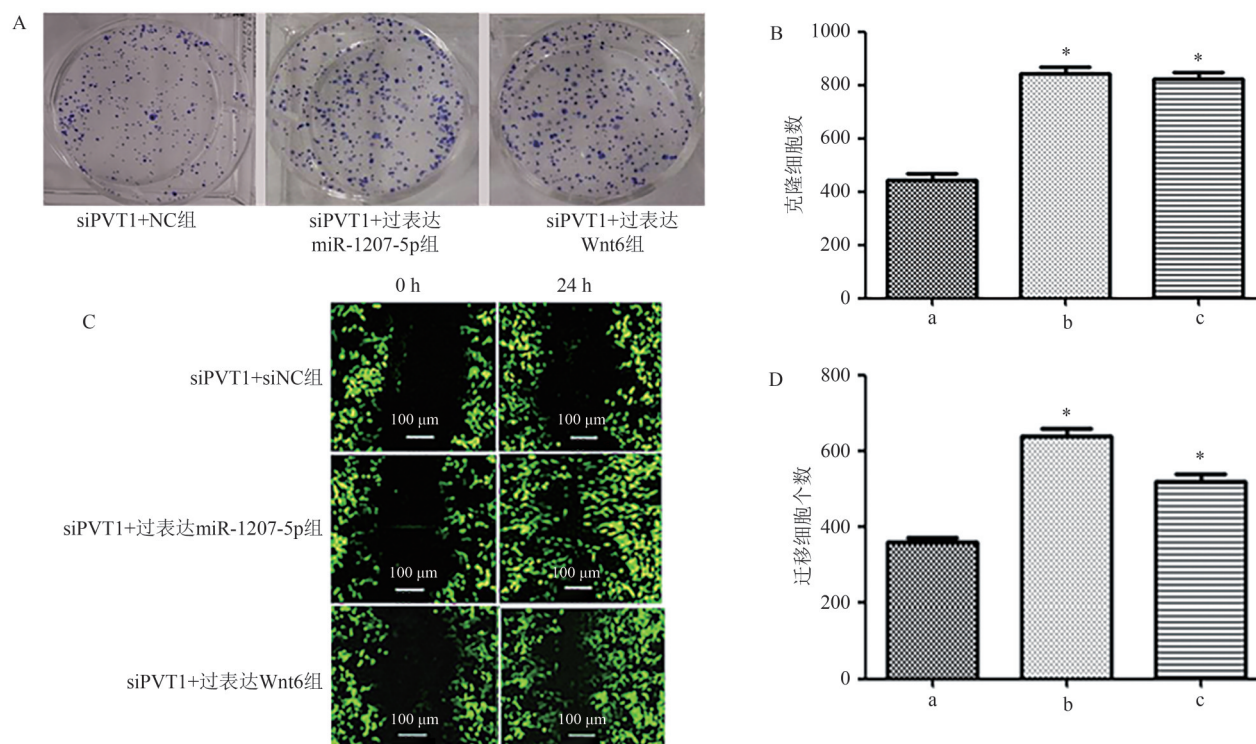


注: (A) Wnt6 和 β-catenin2 在 Ovarcar3 细胞中的相对表达量; (B) Western blotting 检测 Wnt6/β-catenin2 在 Ovarcar3 细胞中的表达。与空白对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Note: (A) The relative expression levels of Wnt6 and β-catenin2 in Ovarcar3 cells; (B) The expressions of Wnt6/β-catenin2 in Ovarcar3 cells detected by Western blotting. Compared with the NC group, * $P < 0.05$.

图 8 PVT1 与 Wnt6/β-catenin2 的作用关系

Fig. 8 Effects of PVT1 on Wnt6/β-catenin2



注: (A) 平板克隆实验检测细胞增殖; (B) 细胞平板克隆计数结果; (C) 划痕实验检测细胞迁移能力; (D) 迁移细胞数。(a) siPVT1+NC 组; (b) siPVT1+过表达 miR-1207-5p 组; (c) siPVT1+过表达 Wnt6 组。与 siPVT1+siNC 组相比, * $P < 0.05$ 。

Note: (A) Proliferation of cells detected by plate cloning experiment; (B) Plate cloning counting of Ovarcar3 cells in each group; (C) The migration ability of cells detected by scratch test; (D) Number of migrating cells. (a) siPVT1 + NC group; (b) siPVT1+ overexpressed miR-1207-5p group; (c) siPVT1+ overexpressed Wnt6 group. Compared with the siPVT1+siNC group, * $P < 0.05$.

图 9 过表达 miR-1207-5p、Wnt6 验证 PVT1 对 Ovarcar3 细胞的影响

Fig. 9 Overexpressed miR-1207-5p and Wnt6 verified the effect of PVT1 on Ovarcar3 cells

法和预后指标判定有着重要意义。

研究发现, lncRNA 在肿瘤细胞增殖、侵袭、转移等过程中起着重要的调节作用, 因此, 近年来关于 lncRNA 的研究逐渐深入。PVT1 是一种在肿瘤细胞中特异性高表达的 lncRNA, 已被证明能够影响多种

肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[10]。当前研究表明, PVT1 基因位于染色体 8q24 位点, 跨越基因组 300 kD 碱基, 可产生 20 多个转录本^[11]。Zhang 等^[12]采用 qRT-PCR 检测发现, PVT1 在卵巢癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织。Chen 等^[13]研究表明, 在卵

巢癌患者癌组织、血清及卵巢癌细胞分化过程中, PVT1 的表达水平异常升高, 而 PVT1 被沉默后, 卵巢癌细胞的增殖能力减弱, 并且与增殖相关的基因表达水平下降, 由此推测 PVT1 对卵巢癌细胞的增殖起到促进作用。本研究采用 qRT-PCR 检测 PVT1 在高级别浆液性卵巢癌组织和癌旁正常组织中的表达, 发现 PVT1 在卵巢癌组织中的表达水平明显高于癌旁正常组织, 也据此证实了我们的推论, 即 PVT1 在卵巢的发生发展中可能起着重要作用。为了进一步研究 PVT1 在高级别浆液性卵巢癌中的作用机制, 本研究选择高级别浆液性卵巢癌细胞株 Ovar3 构建了 PVT1 沉默细胞系, 结果显示, 沉默 PVT1 后, Ovar3 细胞的增殖、侵袭和迁移能力明显下降。

研究表明, miRNA 是内源性单链非编码小分子 RNA, 通过碱基不完全互补的方式与靶基因结合, 可影响多种恶性肿瘤的发生及发展过程^[14]。本研究应用 TargetScan 数据库预测 miR-1207-5p 与 PVT1 存在结合位点, 双荧光素酶报告基因分析显示, miR-1207-5p 与 PVT1 具有靶向调控关系。Hou 等^[15]研究发现, miR-1207-5p 在卵巢癌组织中的表达水平低于癌旁正常组织, 上调 miR-1207-5p 表达可促进卵巢癌细胞的增殖和迁移, miR-1207-5p 作为癌基因, 对卵巢癌的进展具有促进作用。本研究中, 沉默 PVT1 后, Ovar3 细胞中 miR-1207-5p 的表达下调, 而过表达 miR-1207-5p 可逆转 PVT1 沉默后 Ovar3 细胞的生物学行为, 提示 PVT1 促进 Ovar3 细胞增殖可能与上调 miR-1207-5p 表达有关。TargetScan 网站预测结果显示, miR-1207-5p 可互补结合 Wnt6/ β -catenin2。Wnt6/ β -catenin2 是多细胞动物体内一种高度保守的信号通路, 参与细胞的自我更新、分化、增殖以及凋亡等多项生理进程, 与肿瘤的发生发展存在着极其密切的关系, 而 β -catenin2 是其重要调控靶点^[16]。Wnt6/ β -catenin2 通路活化可导致 β -catenin2 在细胞质内大量累积并进入细胞核, 与其下游靶点 Cyclin D1 等持续相互作用, 促进细胞从 G₁ 期进入 S 期, 使细胞发生分裂和增殖, 诱导致瘤病理进程的发生^[17]。研究表明, 上皮性卵巢癌中存在 Wnt6/ β -catenin2 信号通路的异常活化^[18]。本研究发现, Ovar3-siPVT1 组细胞 β -Catenin 磷酸化水平明显降低, 而沉默 PVT1 后, 过表达 Wnt6 细胞的增殖和迁移能力均发生逆转, 推断 PVT1 可能通过调节 Wnt6/ β -catenin2 信号通路影响

肿瘤进展。

综上所述, lncRNA PVT1 在高级别浆液性卵巢癌中高表达, 高表达 PVT1 可能通过上调 miR-1207-5p 表达、增强 Wnt6/ β -catenin2 信号通路活性, 促进高级别浆液性卵巢癌细胞的增殖、侵袭和迁移, 为新型生物药品的研发提供了一定的理论支持和新的方向。

参考文献

- [1] 李会俭, 付军, 赵敏, 等. LincRNA-ROR 在高级别浆液性卵巢癌中的表达及临床意义[J]. 中国临床研究, 2019, 32(4): 538-541. DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2019.04.026.
- [2] CHEN Y, DU H, BAO L W, et al. LncRNA PVT1 promotes ovarian cancer progression by silencing miR-214 [J]. Cancer Biol Med, 2018, 15(3): 238-250. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0174.
- [3] 万仁强, 林勇, 肖平, 等. 沉默 lncRNA PVT1 对鼻咽癌细胞 C666-1 增殖、侵袭转移的影响[J]. 实用医学杂志, 2018, 34: 1613-1617.
- [4] 王新荣, 张印坡, 张延新. 青藤碱抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞活力、迁移和侵袭[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(5): 793-798. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2018.05.004.
- [5] MUNSCHAUER M, NGUYEN C T, SIROKMAN K, et al. Publisher Correction: The NORAD lncRNA assembles a topoisomerase complex critical for genome stability [J]. Nature, 2018, 563(7733): E32. DOI: 10.1038/s41586-018-0584-2.
- [6] TANG J M, LI Y X, SANG Y Z, et al. LncRNA PVT1 regulates triple-negative breast cancer through KLF5/ β -catenin signaling [J]. Oncogene, 2018, 37(34): 4723-4734. DOI: 10.1038/s41388-018-0310-4.
- [7] CZEKIERDOWSKI A, STACHOWICZ N, CZEKIERDOWSKA S, et al. Prognostic significance of TEM7 and nestin expression in women with advanced high grade serous ovarian cancer[J]. Ginekologia Polska, 2018, 89(3): 135-141. DOI: 10.5603/GP.a2018.0023.
- [8] 郭春芳, 李华强, 陈晏林. 卵巢癌患者组织中 lncRNA NEAT1 和 CTBP2 表达水平及其与临床病理特征的关系[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(12): 1285-1289. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2018.12.016.
- [9] WANG C H, HAN C F, ZHANG Y B, et al. LncRNA PVT1 regulate expression of HIF1 α via functioning as ceRNA for miR-199a-5p in non-small cell lung cancer under hypoxia [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1): 1105-1110. DOI: 10.3892/mmr.2017.7962.
- [10] ZHAO T, DING Y, LI M, et al. Silencing lncRNA PVT1 inhibits activation of astrocytes and increases BDNF expression in hippocampus tissues of rats with epilepsy by downregulating the Wnt signaling pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(9): 2349-2358.

- 16054–16067. DOI:10.1002/jcp.28264.
- [11] ZHAO L, KONG H R, SUN H W, et al. LncRNA-PVT1 promotes pancreatic cancer cells proliferation and migration through acting as a molecular sponge to regulate miR-448 [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5): 4044–4055. DOI: 10.1002/jcp.26072.
- [12] LIU E L, LIU Z, ZHOU Y X, et al. Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in ovarian cancer cells promotes cisplatin resistance by regulating apoptotic pathways [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(11): 20565–20572.
- [13] 刘冰, 郑明男, 刘立峰, 等. LncRNA PVT1 促进卵巢癌细胞自噬相关机制研究[J]. *解剖科学进展*, 2019, 25(1): 4–7. DOI: 10.16695/j.cnki.1006–2947.2019.01.002.
- [14] SONG P, YIN S C. Long non-coding RNA 319 facilitates nasopharyngeal carcinoma carcinogenesis through regulation of miR-1207-5p/KLF12 axis [J]. *Gene*, 2019, 680: 51–58. DOI: 10.1016/j.gene.2018.09.032.
- [15] HOU X K, NIU Z F, LIU L L, et al. miR-1207-5p regulates the sensitivity of triple-negative breast cancer cells to Taxol treatment via the suppression of LZTS1 expression [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 990–998. DOI: 10.3892/ol.2018.9687.
- [16] RUSSELL J O, MONGA S P. Wnt/ β -catenin signaling in liver development, homeostasis, and pathobiology [J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2018, 13(1): 351–378. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020117-044010.
- [17] Yoshida T, Sopko NA, Kates M, et al. Three-dimensional organoid culture reveals involvement of Wnt/ β -catenin pathway in proliferation of bladder cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(13):11060–11070. DOI: 10.18632/oncotarget.24308.
- [18] 侯建峰, 吴小华. 上皮性卵巢癌中 Wnt/ β -catenin 信号通路对间皮素表达的影响[J]. *现代妇产科进展*, 2018, 27(6): 434–438. DOI: 10.13283/j.cnki.xdfckjz.2018.06.009.
- 收稿日期: XXXX-XX-XX 校稿:

本文引用格式: 姚艳, 黄秀敏, 刘争进. LncRNA PVT1 通过 miR-1207-5p 靶向调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对高级别浆液性卵巢癌的影响[J]. *肿瘤药*, 2021, 11(5): 561–569. DOI: 10.3969/j.issn.2095–1264.2021.05.08.

Cite this article as: YAO Yan, HUANG Xiumin, LIU Zhengjin. Effects of lncRNA PVT1 on high-level serous ovarian cancer by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway through miR-1207-5p[J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2021, 11(5): 561–569. DOI: 10.3969/j.issn.2095–1264.2021.05.08.