

朱玲,蔡伟莉,刘超,等. miR-518a-5p/HDAC6 轴参与卵巢癌 SKOV3 细胞 DNA 氧化损伤的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(3): 71-81.

Zhu L, Cai WL, Liu C, et al. Mechanism of miR-518a-5p/HDAC6 axis in DNA oxidative damage in ovarian cancer SKOV3 cells [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(3): 71-81.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.03.007

miR-518a-5p/HDAC6 轴参与卵巢癌 SKOV3 细胞 DNA 氧化损伤的作用机制

朱玲,蔡伟莉*,刘超,许国莹,张苗,叶耘峰

(江苏护理职业学院 医学技术学院,江苏 淮安 223005)

【摘要】 目的 探讨 miR-518a-5p/组蛋白去乙酰酶 6 (histone deacetylase 6, HDAC6) 轴参与卵巢癌 (ovarian cancer, OC) SKOV3 细胞 DNA 氧化损伤的作用机制。方法 实时荧光定量逆转录 PCR (qRT-PCR) 检测 OC 组织和不同癌细胞 (A2780、SKOV3、CAOV3) 中 miR-518a-5p、HDAC6 mRNA 表达,将 SKOV3 细胞分为 Control 组、miR-NC 组、miR-518a-5p mimics 组、miR-518a-5p mimics + pcDNA-NC 组、miR-518a-5p mimics + pc-HDAC6 组。利用平板克隆与 Hoechst33258 染色分析细胞增殖与凋亡情况;免疫荧光法检测磷酸化组蛋白 H2AX (phosphorylated histone H2AX, γ -H2AX) 表达;流式细胞仪分析活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平;Western blot 法分析 HDAC6、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 表达;双荧光素酶分析 miR-518a-5p 与 HDAC6 的调节关系。通过异种移植肿瘤模型研究 miR-518a-5p 对 OC 细胞 DNA 氧化损伤的影响及机制。结果 OC 组织和 A2780、SKOV3、CAOV3 细胞中 miR-518a-5p 表达降低,HDAC6 表达升高 ($P < 0.001$);SKOV3 细胞中 miR-518a-5p 表达最低,HDAC6 表达最高,故选择 SKOV3 细胞进行后续实验。与 miR-NC 组比较,miR-518a-5p mimics 组 miR-518a-5p 表达、细胞凋亡率、 γ -H2AX 阳性细胞数、ROS 相对荧光强度、Bax 表达升高,HDAC6 mRNA 及蛋白表达、Bcl-2 表达、集落形成数降低 ($P < 0.001$);与 miR-518a-5p mimics + pcDNA-NC 组比较,miR-518a-5p mimics + pc-HDAC6 组 HDAC6 mRNA 及蛋白表达、集落形成数、Bcl-2 表达升高,细胞凋亡率、 γ -H2AX 阳性细胞数、ROS 相对荧光强度、Bax 表达降低 ($P < 0.001$);HDAC6 与 miR-518a-5p 存在靶向调控关系。体内实验结果显示,过表达 miR-518a-5p 降低移植瘤体积、重量及肿瘤组织 HDAC6 蛋白表达,增高 γ -H2AX 阳性表达 ($P < 0.001$);在过表达 miR-518a-5p 的基础上上调 HDAC6 表达后,移植瘤体积、重量及 HDAC6 蛋白表达升高, γ -H2AX 阳性表达下降 ($P < 0.05$)。结论 OC 组织和细胞中 miR-518a-5p 表达降低,HDAC6 表达升高,过表达 miR-518a-5p 可通过抑制 HDAC6 表达,诱导 SKOV3 细胞 DNA 氧化损伤,进而抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。

【关键词】 miR-518a-5p;组蛋白去乙酰酶 6;卵巢癌;DNA 氧化损伤;细胞凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 03-0071-11

Mechanism of miR-518a-5p/HDAC6 axis in DNA oxidative damage in ovarian cancer SKOV3 cells

【基金项目】 江苏省卫生健康委员会科研面上项目 (M2022004);淮安市科学技术局市创新服务能力建设计划-重点实验室项目 (HAP202004)。

【作者简介】 朱玲 (1990—),女,硕士,实验师,研究方向:临床检验诊断教学和科研。E-mail:zling200560@163.com

【通信作者】 蔡伟莉 (1979—),女,博士,研究员,研究方向:基因表达和分子检验检测。E-mail:caiweili2022@jscn.edu.cn

ZHU Ling, CAI Weili*, LIU Chao, XU Guoying, ZHANG Miao, YE Yunfeng
(School of Medical Technology, Jiangsu College of Nursing, Huaian 223005, China)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of the miR-518a-5p/histone deacetylase 6 (HDAC6) axis in DNA oxidative damage in ovarian cancer (OC) SKOV3 cells. **Methods** Expression levels of miR-518a-5p and HDAC6 mRNA in OC tissues and in various cancer cells (A2780, SKOV3, CAOV3) were detected by qRT-PCR. SKOV3 cells were separated into Control, miR-NC, miR-518a-5p mimics, miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC, and miR-518a-5p mimics+pc-HDAC6 groups. Cell proliferation and apoptosis were analyzed by colony-forming assay and Hoechst 33258 staining. Expression of phosphorylated histone H2AX (γ -H2AX) was detected by immunofluorescence assay and reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry. HDAC6, Bcl-2-associated X protein (Bax), and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein expression were analyzed by Western blot. The regulatory relationship between miR-518a-5p and HDAC6 was analyzed by dual luciferase assay. The effect and mechanism of miR-518a-5p on oxidative DNA damage in OC cells were studied in a xenotransplantation tumor model. **Results** miR-518a-5p expression was decreased and HDAC6 expression was increased in OC tissues and A2780, SKOV3, and CAOV3 cells ($P<0.001$). Expression levels of miR-518a-5p were lowest and expression levels of HDAC6 were highest in SKOV3 cells, and SKOV3 cells were therefore selected for subsequent experiments. miR-518a-5p expression, apoptosis rate, number of γ -H2AX-positive cells, relative ROS fluorescence intensity, and expression of Bax were all higher in the miR-518a-5p mimics group compared with the miR-NC group, while HDAC6 mRNA and protein expression, Bcl-2 expression, and colony-formation number were all lower ($P<0.001$). HDAC6 mRNA and protein expression, colony-formation number, and expression of Bcl-2 were higher in the miR-518a-5p mimics+pc-HDAC6 group compared with the miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC group, and the apoptosis rate, number of γ -H2AX-positive cells, relative ROS fluorescence intensity, and expression of Bax were all lower ($P<0.001$). HDAC6 had a targeted regulatory relationship with miR-518a-5p. Overexpression of miR-518a-5p decreased tumor volume, weight, and HDAC6 protein expression in tumor tissues, and increased γ -H2AX expression *in vivo* ($P<0.001$). Upregulation of HDAC6 expression by overexpression of miR-518a-5p increased graft tumor volume, weight, and HDAC6 protein expression and decreased γ -H2AX-positive expression ($P<0.05$). **Conclusions** miR-518a-5p expression is reduced and HDAC6 expression is increased in OC tissues and cells. Overexpression of miR-518a-5p can induce oxidative DNA damage in SKOV3 cells by inhibiting HDAC6 expression, thereby inhibiting cell proliferation and promoting cell apoptosis.

【Keywords】 miR-518a-5p; histone deacetylase 6; ovarian cancer; DNA oxidative damage; cell apoptosis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

卵巢癌(ovarian cancer, OC)是全球妇科癌症中死亡率最高的异质性疾病,恶性程度高,严重影响患者生命健康安全^[1]。目前,包括分子靶向干预在内的 OC 患者的治疗策略尚未得到广泛使用。设计和开发新的抗癌疗法对于提高 OC 的生存能力意义重大^[2]。越来越多的证据表明,微小 RNAs(microRNAs, miR)在 OC 的发生和发展中起作用,可能是诊断和预后的重要生物标志物^[3]。研究发现,miR-518a-5p 通过调控 ZEB2 抑制乳腺癌迁移、侵袭和上皮间质转化过程^[4]。miR-518a-5p 通过调控 CCR6 抑制弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的增殖和侵袭^[5]。过表达 miR-518a-5p 可通过降低 HDAC2 表达促进甲状腺鳞癌细胞的凋亡^[6]。

组蛋白去乙酰酶 6(histone deacetylase 6, HDAC6)可调节氧化应激、自噬和 DNA 损伤反应等多种生理过程,其高表达与癌症进程有关。研究发现,选择性抑制 HDAC6 可诱导 DNA 损伤,促进口腔鳞状细胞癌细胞凋亡,抑制肿瘤增殖^[7]。HDAC6 选择性抑制剂与抗癌药物联合使用可增强抗癌药物在 OC 细胞中的抗癌作用^[8]。HDAC6 与 DNA 损伤修复因子(poly ADP-ribose polymerase, PARP)的相互作用可作为增强高级别浆液性 OC 的治疗靶点^[9]。经生物信息学分析显示,miR-518a-5p 与 HDAC6 存在靶向结合位点。但 miR-518a-5p 通过调节 HDAC6 对 OC 细胞 DNA 氧化损伤的影响尚未有研究报道。本研究以 SKOV3

细胞为研究对象,体外探索 miR-518a-5p 对 OC 细胞增殖、凋亡和 DNA 氧化损伤影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

30 只 5 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 裸鼠,体重约 23 g,购自常州卡文斯实验动物有限公司[SCXK(苏)2021-0013]。裸鼠饲养在江苏凌菲生物科技有限公司淮安分公司 SPF 级鼠房[SYXK(苏)2023-0068],饲养温度 20~27℃,相对湿度 40%~60%,光照周期为 12 h,黑暗周期为 12 h,每小时通风 10~20 次的无菌室中,自由获取食物和水。动物实验程序经江苏护理职业学院伦理委员会批准(202304012)。实验研究过程中做到了 3R 原则。

1.1.2 细胞

人正常卵巢上皮细胞 IOSE80 及 OC 细胞系(A2780、SKOV3、CAOV3)来自美国 ATCC。

1.1.3 样本

收集 2022 年 1 月~2023 年 12 月江苏护理职业学院保存的 50 例 OC 患者的肿瘤组织,另收集相同时间段江苏护理职业学院保存的 50 例 OC 患者的癌旁组织(距离癌组织 3 cm)。将收集的组织储存在-80℃的 RNA Keeper 组织稳定剂中。该实验方案经江苏护理职业学院伦理委员会审核通过(20240103)。

1.2 主要试剂与仪器

磷酸甘油醛脱氢酶(reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、U6、miR-518a-5p 和 HDAC6 引物由上海普迪生物技术有限公司合成;1%结晶紫染色液(批号:G1062,上海彩佑实业有限公司);2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-

DA)探针(批号:SB-D1002,上海圣尔生物科技有限公司);ECL 化学发光检测试剂盒(批号:BL523B,北京兰杰柯科技有限公司);二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒(批号:BJ-R66629,上海邦景实业有限公司);兔源一抗磷酸化组蛋白 H2AX (phosphorylated histone H2AX, γ -H2AX)(批号:ab229914)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)(批号:ab182733)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)(批号:ab692)、GAPDH(批号:ab181602)和辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG(批号:ab133470)均购于美国 Abcam 公司;实时荧光定量逆转录 PCR(real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)试剂盒(批号:ZY-96028,上海泽叶生物科技有限公司);RNA 提取试剂盒(批号:EZB-TZ1-L,上海海方生物技术有限公司)。

流式细胞仪(型号:EXFLOW-206,北京达科为生物技术有限公司);qPCR 仪(型号:Esan-Gene 496/496A,杭州奥盛仪器有限公司);荧光显微镜(型号:BX53,日本 Olympus 公司);离心机(型号:V18R,上海然哲仪器设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 qRT-PCR 检测 miR-518a-5p 和 HDAC6 mRNA 表达

TRIzol 试剂纯化组织和细胞中的总 RNA,用 miRNA 分离试剂盒提取 miRNA。使用 Quantitect Reverse Transcriptase Kit 将 RNA 逆转录。在 ABI PRISM 7500 快速序列检测系统上使用 SYBR-Green PCR 预混液进行 qPCR 反应,循环数为 40。循环条件:95℃,15 min、94℃,30 s、56℃,30 s、72℃,30 s。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析法评估 mRNA 的相对表达水平,以 GAPDH、U6 标准化 mRNA 水平作为参考基因,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因 Gene	上游引物(5'-3') Upstream primer (5'-3')	下游引物(5'-3') Downstream primer (5'-3')
miR-518a-5p	CGCGCTGCAAAGGGAAGC	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
HDAC6	GTCTACTGTGTCGTTACATC	GGCCTGACAGTACTAACAC
GAPDH	ATGATGATATCAAGAGGCTAGT	GTATCCAAACTATTGTCATAC
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.3.2 细胞转染

将 SKOV3 细胞分为 Control 组、miR-NC 组、miR-518a-5p mimics 组、miR-518a-5p mimics + pcDNA-NC 组、miR-518a-5p mimics + pc-HDAC6 组。各组细胞在转染前在 24 孔培养皿(5.0×10^4 /孔)培养 2 h, 随后用 Lipofectamine[®] 2000 转染试剂进行转染。

1.3.3 平板克隆实验

将 SKOV3 细胞接种于 6 孔板中(1×10^4 /孔), 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液在 5% CO₂, 37 °C 下培养 15 d。在室温下菌落经 4% 多聚甲醛和结晶紫处理后计数(大于 100 个细胞的集落)。

1.3.4 Hoechst33258 染色

对数生长期的 SKOV3 细胞接种 6 孔板中(1×10^4 /孔), 多聚甲醛固定后, 用 PBS 洗涤, 用 10 μ g/mL Hoechst33258 溶液在 37 °C 黑暗下染色 15 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 抗淬灭封片剂封片, 并在荧光显微镜中观察(350 nm 激发光)。随机选取 3 处视野拍照。计算凋亡率, 计算公式: 凋亡率% = 亮蓝色细胞数/总细胞数。

1.3.5 γ -H2AX 免疫荧光染色

将 SKOV3 细胞接种于 96 孔板中(4×10^3 /孔), 37 °C 恒温培养箱放置 24 h 后, 弃培养基并固定。用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 溶液在 4 °C 下透化细胞 10 min, 用 PBS 洗涤。PBS 封闭 30 min 后洗涤。加入一抗 γ -H2AX(按 1 : 200 稀释)在 4 °C 下孵育过夜。PBS 洗涤后, 将细胞与 Alexa Fluor 488 标记的二抗孵育 1 h, PBS 洗涤, DAPI 染色 5 min, 置于荧光显微镜下观察。与细胞核共定位且呈现紫色的部分代表免疫荧光阳性区域, 表征发生 DNA 损伤的细胞。

1.3.6 流式细胞仪测定活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平

将 SKOV3 细胞接种于 6 孔板中(1×10^4 /孔)孵育 24 h。通过胰蛋白酶消化收集细胞至 Ep 管, DMEM 培养液重悬细胞。按照 1 : 1000 加入 DCFH-DA 探针, 37 °C 下黑暗培养 20 min。DMEM 培养液重悬细胞, 将细胞用滤膜过滤至洁净流式管中。采用流式细胞仪对过滤后的细胞进行分析, 通过归一化处理得到 DCFH-DA 相对荧光强度。

1.3.7 HDAC6、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达检测

SKOV3 细胞加入 RIPA 裂解液裂解, 离心后

取上清液。BCA 法定量蛋白浓度。通过 10% SDS-PAGE 电泳, 并转至 PVDF 膜上。脱脂牛奶封闭膜 1 h, 随后稀释一抗, HDAC6(1 : 1000)、Bax(1 : 1000)、Bcl-2(1 : 1000)和 GAPDH(1 : 1000)4 °C 一抗孵育过夜。TBST 洗涤膜后, 将膜与二抗(辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG)(1 : 2000)在室温孵育 1 h。ECL 检测试剂盒进行可视化, Image Pro Plus 6.0 对蛋白进行定量。

1.3.8 双荧光素酶实验

将野生型(WT)HDAC6 序列扩增并插入 pmirGLO 载体中以构建报告载体 pmirGLO-HDAC6-WT(HDAC6-WT)。GeneArt[™] 定点诱变 PLUS 系统用于突变 HDAC6 与 miR-518a-5p 的结合位点。将突变体(MUT)HDAC6 序列插入 pmirGLO 载体中以构建 pmirGLO-HDAC6-MUT(HDAC6-MUT)。将报告载体和 miR-518a-5p mimic 或 miR-NC 共转染到 SKOV3 细胞中, 培养 48 h 后, 计算荧光素酶活性。

1.3.9 裸鼠移植瘤实验

30 只裸鼠随机分为 5 组, 即 Control 组、miR-NC 组、miR-518a-5p mimics 组、miR-518a-5p mimics + pcDNA-NC 组、miR-518a-5p mimics + pc-HDAC6 组。转染后, 将每组对数生长期的 SKOV3 细胞制成 1×10^7 /mL 细胞悬液, 每组裸鼠皮下接种 200 μ L 细胞悬液, 次日检测肿瘤形成情况。记录裸鼠体重, 每周测量一次肿瘤的长度和宽度, 按公式体积 = (长 $\times$ 宽²)/2 计算肿瘤体积。第 28 天处死裸鼠, 切除肿瘤。检测肿瘤组织 miR-518a-5p 水平, 以及肿瘤组织 HDAC6 蛋白表达。以免疫组化法检测肿瘤组织 γ -H2AX 表达: 肿瘤组织用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋。石蜡切片厚度为 5 μ m, 将组织切片贴于聚赖氨酸包被的载玻片上, 在 60 °C 下过夜并脱蜡。用抗 γ -H2AX 一抗和山羊抗兔 IgG/HRP 抗体染色。最后在光学显微镜下观察 γ -H2AX 阳性表达, 并以平均荧光强度表示 γ -H2AX 表达水平。

1.4 统计学方法

实验数据用 Graphpad Prism 9.0 和 SPSS 26.0 软件进行分析。符合正态分布的计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间指标的差异比较采用独立样本 *t* 检验; 多组间指标的差异比较用单因素方差分析, SNK-*q* 检验用于两组间

的比较。以 $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 OC 组织和细胞中 miR-518a-5p、HDAC6 mRNA 表达的比较

miR-518a-5p 在 OC 组织和细胞中表达降低, HDAC6 在 OC 组织和细胞中表达升高 ($P<0.001$); SKOV3 细胞中 miR-518a-5p 表达最低,

HDAC6 表达最高(见表 2、表 3)。选择 SKOV3 细胞进行后续实验。

2.2 miR-518a-5p、HDAC6 转染对 SKOV3 细胞增殖的影响

与 miR-NC 组比较, miR-518a-5p mimics 组集落形成数减少 ($P<0.001$); 与 miR-518a-5p mimics + pcDNA-NC 组比较, miR-518a-5p mimics + pc-HDAC6 组集落形成数增加 ($P<0.001$) (见图 1)。

表 2 miR-518a-5p 和 HDAC6 在 OC 组织中的表达 ($\bar{x}\pm s, n=50$)
Table 2 Expression of miR-518a-5p and HDAC6 in OC tissues ($\bar{x}\pm s, n=50$)

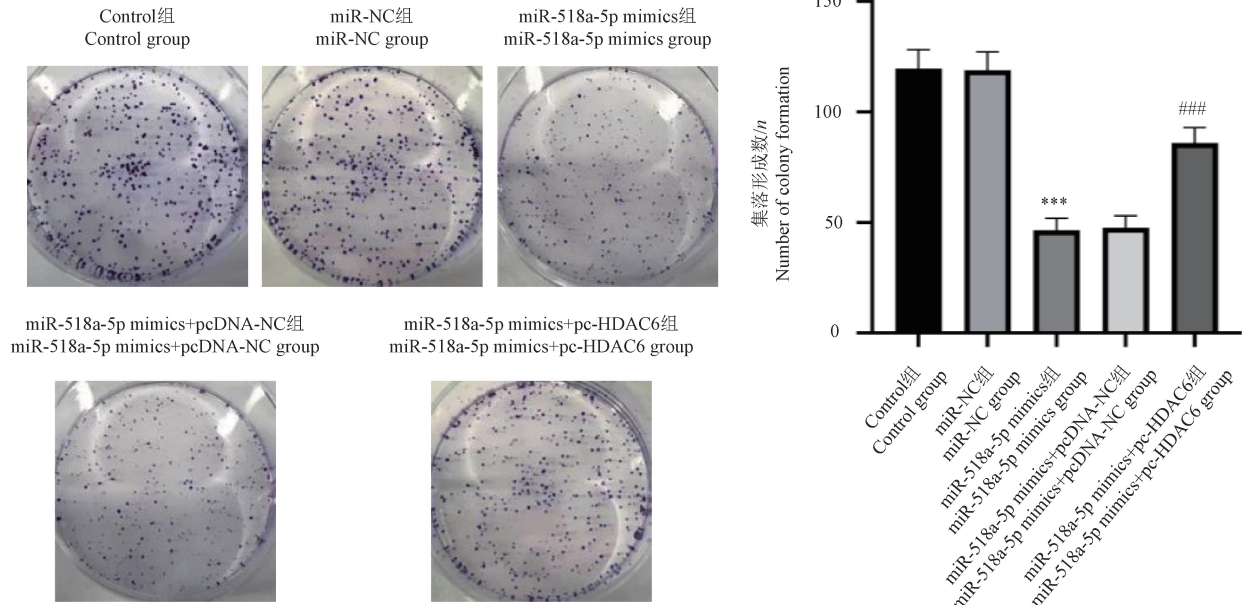
分组 Groups	miR-518a-5p	HDAC6 mRNA
癌旁组织 Para-carcinoma tissue	1.00±0.10	1.00±0.08
OC 组织 OC tissue	0.21±0.04***	2.49±0.15***

注:与癌旁组织相比, *** $P<0.001$ 。
Note. Compared with para-carcinoma tissue, *** $P<0.001$.

表 3 miR-518a-5p 和 HDAC6 在 OC 细胞中的表达 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 3 Expression of miR-518a-5p and HDAC6 in OC cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组 Groups	miR-518a-5p	HDAC6 mRNA
IOSE80 细胞 IOSE80 cells	1.00±0.09	1.00±0.12
A2780 细胞 A2780 cells	0.20±0.03***	3.01±0.23***
SKOV3 细胞 SKOV3 cells	0.14±0.02***	3.27±0.20***
CAOV3 细胞 CAOV3 cells	0.25±0.04***	2.84±0.21***

注:与 IOSE80 细胞相比, *** $P<0.001$ 。
Note. Compared with IOSE80 cells, *** $P<0.001$.



注:与 miR-NC 组相比, *** $P<0.001$; 与 miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC 组相比, ### $P<0.001$ 。

图 1 各组 SKOV3 细胞集落形成情况 ($n=6$)

Note. Compared with miR-NC group, *** $P<0.001$. Compared with miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC group, ### $P<0.001$.

Figure 1 SKOV3 cell colony formation in each group ($n=6$)

2.3 miR-518a-5p、HDAC6 转染效率验证

与 miR-NC 组比较,miR-518a-5p mimics 组 miR-518a-5p 表达升高,HDAC6 表达降低 ($P < 0.001$);与 miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC 组比较,miR-518a-5p mimics+pc-HDAC6 组 HDAC6 表达升高($P < 0.001$)(见表 4)。

2.4 miR-518a-5p、HDAC6 转染对 SKOV3 细胞凋亡的影响

与 miR-NC 组比较,miR-518a-5p mimics 组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.001$);与 miR-518a-5p

mimics+pcDNA-NC 组比较,miR-518a-5p mimics + pc-HDAC6 组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.001$) (见图 2)。

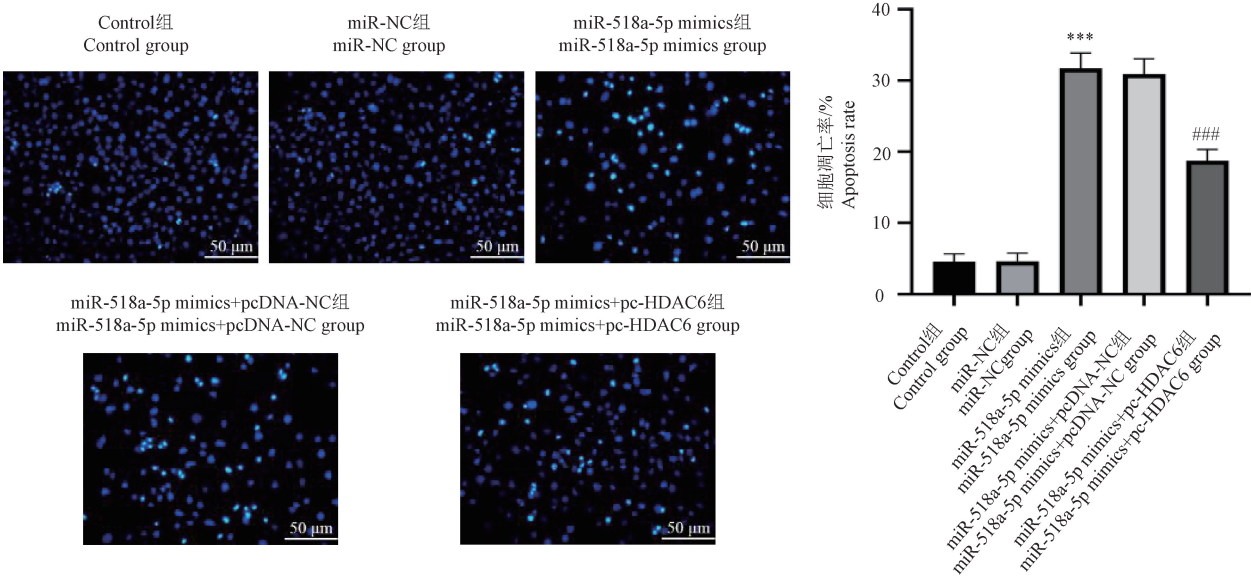
2.5 miR-518a-5p、HDAC6 转染对 SKOV3 细胞中 γ -H2AX 表达影响

与 miR-NC 组比较,miR-518a-5p mimics 组 γ -H2AX 阳性细胞数增多 ($P < 0.001$);与 miR-518a-5p mimics + pcDNA-NC 组比较,miR-518a-5p mimics+pc-HDAC6 组 γ -H2AX 阳性细胞数减少 ($P < 0.001$)(见图 3)。

表 4 各组 SKOV3 细胞中 miR-518a-5p 和 HDAC6 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 4 Comparison of miR-518a-5p and HDAC6 expression in SKOV3 cells of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组 Groups	miR-518a-5p	HDAC6 mRNA
Control 组 Control group	1.00±0.08	1.00±0.11
miR-NC 组 miR-NC group	1.00±0.09	1.01±0.12
miR-518a-5p mimics 组 miR-518a-5p mimics group	2.35±0.17***	0.38±0.14***
miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC 组 miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC group	2.46±0.15	0.35±0.13
miR-518a-5p mimics+pc-HDAC6 组 miR-518a-5p mimics+pc-HDAC6 group	2.32±0.16	1.26±0.11###

注:与 miR-NC 组相比,*** $P < 0.001$;与 miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC 组相比,### $P < 0.001$ 。
Note. Compared with miR-NC group, *** $P < 0.001$. Compared with miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC group, ### $P < 0.001$.

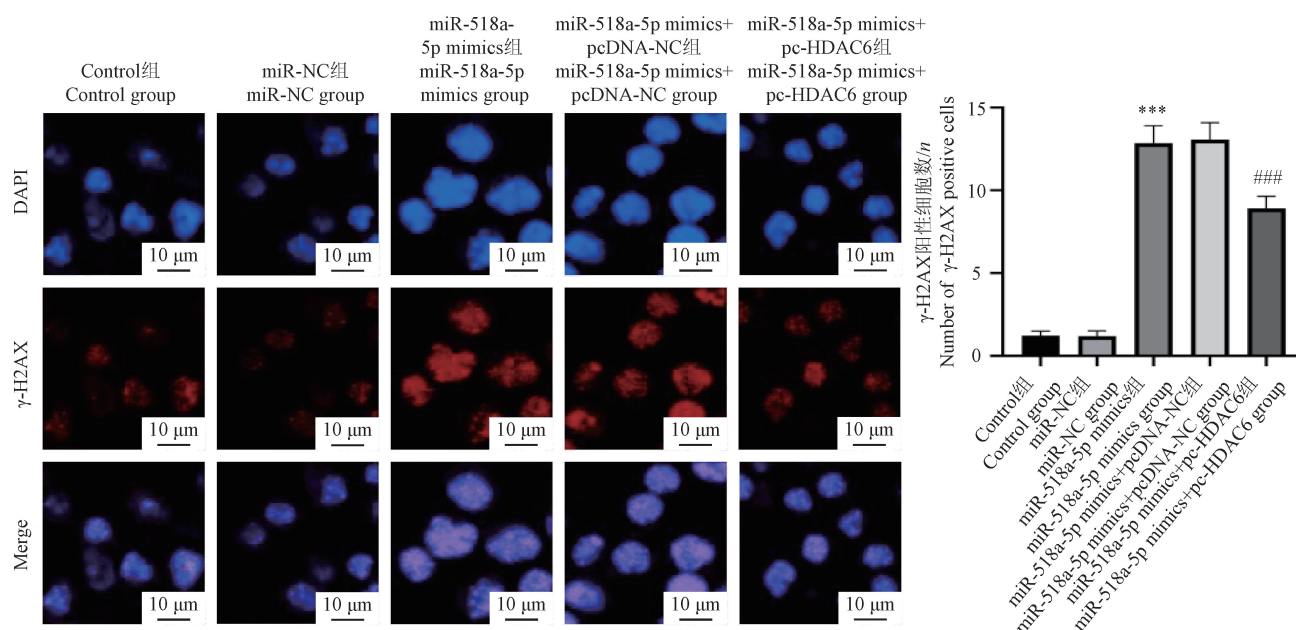


注:与 miR-NC 组相比,*** $P < 0.001$;与 miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC 组相比,### $P < 0.001$ 。

图 2 各组 SKOV3 细胞凋亡比较 (Hoechst33258 染色, $n = 6$)

Note. Compared with miR-NC group, *** $P < 0.001$. Compared with miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC group, ### $P < 0.001$.

Figure 2 Comparison of apoptosis of SKOV3 cells in each group (Hoechst33258 staining, $n = 6$)



注:与 miR-NC 组相比, *** $P < 0.001$; 与 miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC 组相比, ### $P < 0.001$ 。

图 3 免疫荧光染色观察 γ -H2AX 表达 ($n=6$)

Note. Compared with miR-NC group, *** $P < 0.001$. Compared with miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC group, ### $P < 0.001$.

Figure 3 Expression of γ -H2AX was observed by immunofluorescence staining ($n=6$)

2.6 miR-518a-5p、HDAC6 转染对 SKOV3 细胞中 ROS 的影响

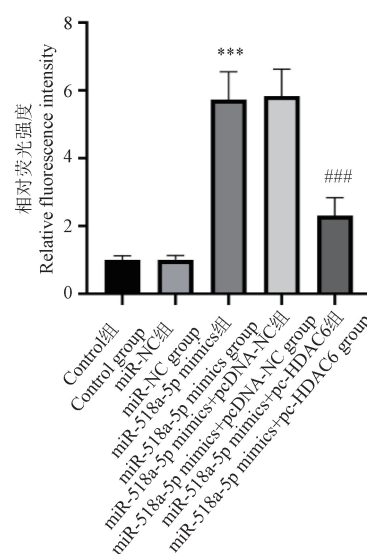
与 miR-NC 组比较, miR-518a-5p mimics 组 ROS 相对荧光强度升高 ($P < 0.001$); 与 miR-518a-5p mimics + pcDNA-NC 组比较, miR-518a-5p mimics+pc-HDAC6 组 ROS 相对荧光强度降低 ($P < 0.001$) (见图 4)。

2.7 miR-518a-5p、HDAC6 转染对 SKOV3 细胞中 HDAC6、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

与 miR-NC 组比较, miR-518a-5p mimics 组的 Bcl-2 以及 HDAC6 表达显著降低, Bax 表达显著升高 ($P < 0.001$); 与 miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC 组比较, miR-518a-5p mimics+pc-HDAC6 组的 Bcl-2 和 HDAC6 表达显著升高, Bax 表达显著降低 ($P < 0.001$) (见图 5)。

2.8 miR-518a-5p、HDAC6 靶向关系验证

经生物信息学软件 starbase 分析显示, miR-518a-5p 与 HDAC6 存在互补序列 (见图 6A)。与 HDAC6-WT + miR-NC 组比较, HDAC6-WT + miR-518a-5p mimics 组相对荧光素酶活性降低 ($P < 0.001$) (见图 6B)。

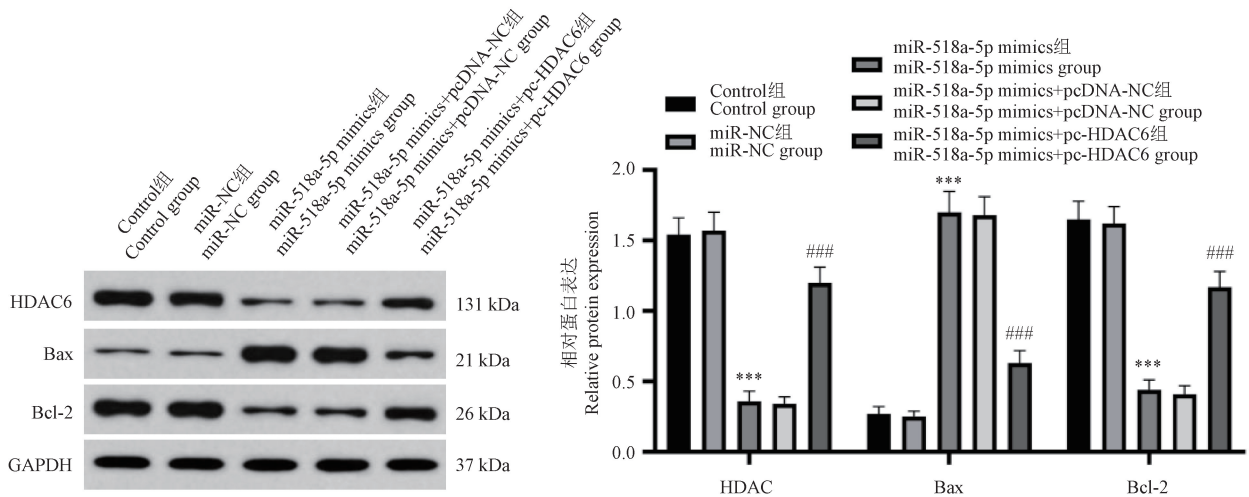


注:与 miR-NC 组相比, *** $P < 0.001$; 与 miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC 组相比, ### $P < 0.001$ 。

图 4 各组 SKOV3 细胞 ROS 相对荧光强度比较 ($n=6$)

Note. Compared with miR-NC group, *** $P < 0.001$. Compared with miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC group, ### $P < 0.001$.

Figure 4 Comparison of ROS relative fluorescence intensity of SKOV3 cells in each group ($n=6$)

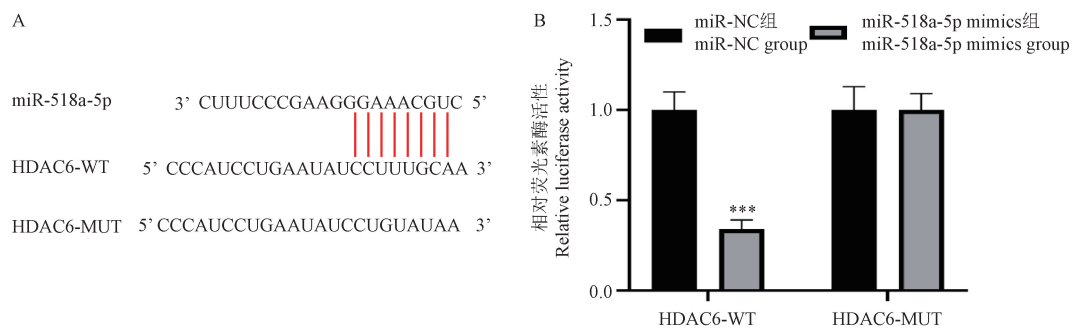


注:与 miR-NC 组相比, *** $P < 0.001$;与 miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC 组相比, ### $P < 0.001$ 。

图 5 各组 SKOV3 细胞中 HDAC6、Bax、Bcl-2 表达比较 ($n=6$)

Note. Compared with miR-NC group, *** $P < 0.001$. Compared with miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC group, ### $P < 0.001$.

Figure 5 Comparison of HDAC6, Bax and Bcl-2 expression in SKOV3 cells of each group ($n=6$)



注:A:HDAC6 与 miR-518a-5p 的结合位点;B:双荧光素酶实验结果。与 miR-NC 组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 6 miR-518a-5p、HDAC6 靶向关系验证

Note. A, Binding site of HDAC6 and miR-518a-5p. B, Results of double luciferase experiment. Compared with miR-NC group, *** $P < 0.001$.

Figure 6 Validation of targeting relationship between miR-518a-5p and HDAC6

2.9 miR-518a-5p、HDAC6 过表达对 SKOV3 细胞体内生长的影响

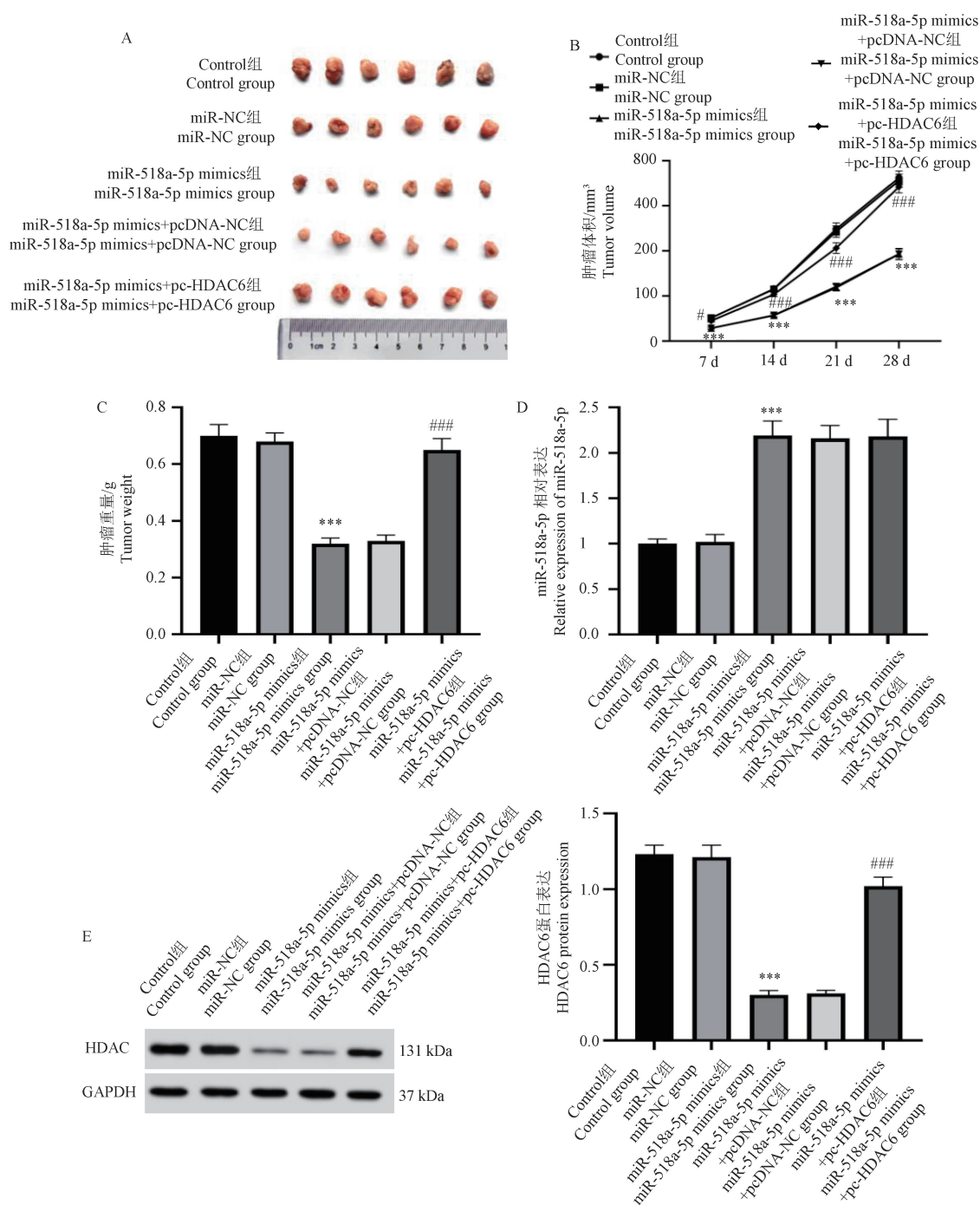
与 miR-NC 组比较,miR-518a-5p mimics 组肿瘤体积与重量下降,miR-518a-5p 表达增高,HDAC6 表达降低, γ -H2AX 表达升高 ($P < 0.001$);与 miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC 组比较,miR-518a-5p mimics+pc-HDAC6 组肿瘤体积与重量升高,HDAC6 表达增高, γ -H2AX 表达下降 ($P < 0.001$) (见图 7、图 8)。

3 讨论

OC 是女性中常见的恶性肿瘤,其死亡率很

高。目前 OC 的标准治疗方法是根治性手术和铂类化疗的组合,虽然 OC 患者最初通常对铂类化疗有反应,但大多数患者仍会出现复发,导致预后不良^[10]。现在的研究重点是新型药物,特别是那些靶向 DNA 损伤反应通路的药物。

miR-518a-5p 是一种肿瘤抑制因子,可抑制各种肿瘤的生长、转移。TURKISTANI 等^[11]研究发现,miR-518a-5p 表达失调与三阴性乳腺癌患者较低的生存率显著相关,可作为三阴性乳腺癌患者的预后标志物;miR-518a-5p 通过降低 IL17RD 表达,降低胶质母细胞瘤细胞的活性,抑制其转移,促进凋亡^[12]。过表达 miR-518a-5p 后可通过降低

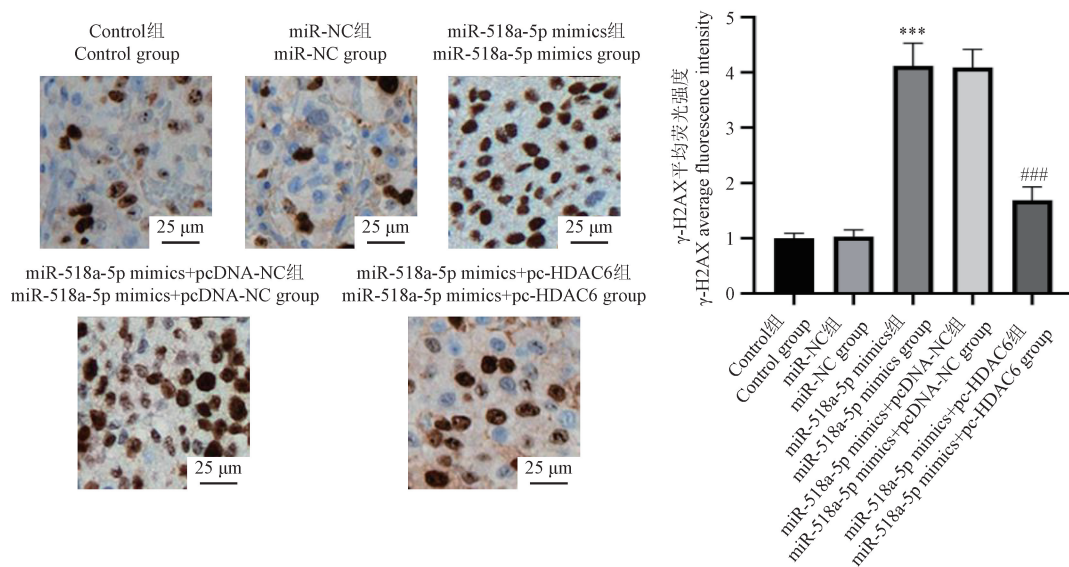


注:A:各组小鼠移植瘤图;B:各组裸鼠移植瘤体积比较;C:各组裸鼠移植瘤重量比较;D:各组肿瘤组织 miR-518a-5p 表达比较;E:各组移植瘤组织中 HDAC6 表达比较。与 miR-NC 组相比, *** $P<0.001$;与 miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC 组相比, # $P<0.05$, ### $P<0.001$ 。

图 7 miR-518a-5p、HDAC6 过表达对 SKOV3 细胞体内生长的影响

Note. A, Transplantation tumor map of mice in each group. B, Comparison of transplanted tumor volume in each group. C, Weight comparison of transplanted tumor in nude mice in each group. D, Comparison of miR-518a-5p expression in tumor tissues of all groups. E, Comparison of HDAC6 expression in transplanted tumor tissues of each group. Compared with miR-NC group, *** $P<0.001$. Compared with miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC group, # $P<0.05$, ### $P<0.001$.

Figure 7 Effects of overexpression of miR-518a-5p and HDAC6 on the growth of SKOV3 cells *in vivo*



注:与 miR-NC 组相比, *** $P<0.001$;与 miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC 组相比, ### $P<0.001$ 。

图 8 各组肿瘤组织 γ -H2AX 表达比较

Note. Compared with miR-NC group, *** $P<0.001$. Compared with miR-518a-5p mimics+pcDNA-NC group, ### $P<0.001$.

Figure 8 Comparison of γ -H2AX expression in tumor tissues of each groups

血管生成素 2 (ANGPT2) 的表达,抑制结直肠癌血管生成、迁移和侵袭^[13]。本研究中发现, miR-518a-5p 在 OC 组织和细胞 (A2780、SKOV3、CAOV3) 中表达降低,与上述研究结果相似,说明 miR-518a-5p 在不同癌细胞中均发挥抑癌作用,其中 SKOV3 细胞的 miR-518a-5p 表达水平最低,故以 SKOV3 细胞进行后续实验。在 SKOV3 细胞中过表达 miR-518a-5p,可抑制 SKOV3 细胞增殖,促进其凋亡。Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白^[14]。Bax 由于其在促进程序性细胞死亡中的作用而参与肿瘤抑制^[15]。为了进一步研究细胞凋亡的机制,本研究测定抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达和促凋亡 Bax 表达,结果发现过表达 miR-518a-5p 显著降低 Bcl-2,升高 Bax 表达。

DNA 损伤与肿瘤发生发展相关。研究表明,诱导氧化应激造成 OC 细胞持续性 DNA 损伤,导致 DNA 双链断裂和 OC 细胞死亡,是 OC 治疗的新方向^[16]。 γ -H2AX 蛋白是 DNA 损伤标志物,在 DNA 双链断裂的情况下,组蛋白 H2AX 在丝氨酸-139 位点磷酸化,磷酸化的 H2AX 在 DNA 双链断裂位点积累,同时募集各种分子,形成焦点,并参与早期 DNA 损伤反应^[17]。本研究发现,过表达 miR-518a-5p 可显著升高 SKOV3 细胞中 γ -

H2AX 表达及 ROS 水平。提示,过表达 miR-518a-5p 可诱导 SKOV3 细胞 DNA 氧化损伤。HDAC6 参与细胞增殖、凋亡、衰老、DNA 损伤和基因组稳定性。研究发现,HDAC6 通过调节错配修复和核苷酸切除修复途径介导 DNA 损伤信号传导^[18]。最近,研究表明,将组蛋白脱乙酰酶抑制剂与 DNA 损伤剂联合使用,以改善 DNA 损伤水平,从而获得更好的实体瘤治疗效果^[19]。HDAC6 抑制剂 MPT0B291 通过降低 DNA 双链断裂修复途径基因的表达 (RAD51 和 CHEK1),减弱了在替莫唑胺敏感、降低替莫唑胺耐药肿瘤细胞的生长^[20]。本研究发现,在 OC 组织和细胞中 HDAC6 表达显著升高,并且在 SKOV3 细胞中,HDAC6 是 miR-518a-5p 的下游靶标,过表达 miR-518a-5p 可降低 HDAC6 mRNA 及蛋白表达水平。而过表达 HDAC6 后,SKOV3 细胞增殖活性增强,细胞凋亡减少,ROS 水平及 γ -H2AX 表达降低,可减弱过表达 miR-518a-5p 对 SKOV3 细胞 DNA 氧化损伤的促进作用。提示,过表达 miR-518a-5p 可通过抑制 HDAC6 表达,诱导 SKOV3 细胞 DNA 氧化损伤,进而抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。此外,本研究通过裸鼠的致瘤性实验验证了 miR-518a-5p 在体内的功能和作用。结果与体外实验结果一

致,表明 miR-518a-5p 可以下调 HDAC6 表达,抑制移植瘤生长和 DNA 氧化损伤。

综上所述,OC 组织和细胞中 miR-518a-5p 表达降低,HDAC6 表达升高。过表达 miR-518a-5p 可通过抑制 HDAC6 表达,诱导 SKOV3 细胞 DNA 氧化损伤,进而抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。过表达 miR-518a-5p 与特异性 HDAC6 抑制剂联用可能是 OC 的治疗的新途径。但本研究未在体内研究 miR-518a-5p 作用,这将是未来研究内容。

参考文献:

- [1] KONSTANTINOPOULOS P A, MATULONIS U A. Clinical and translational advances in ovarian cancer therapy [J]. Nat Cancer, 2023, 4(9): 1239-1257.
- [2] MA H, TIAN T, CUI Z. Targeting ovarian cancer stem cells; a new way out [J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 28.
- [3] ISMAIL A, ABULSOUD A I, FATHI D, et al. The role of miRNAs in ovarian cancer pathogenesis and therapeutic resistance - a focus on signaling pathways interplay [J]. Pathol Res Pract, 2022, 240: 154222.
- [4] WANG L, GUO Z, ZHANG S, et al. MIR-518a-5p targets ZEB2 to suppress the migration and invasion of breast-cancer cells [J]. Altern Ther Health Med, 2023, 29(1): 137-143.
- [5] HUANG Q, ZHANG F, FU H, et al. Epigenetic regulation of miR-518a-5p-CCR6 feedback loop promotes both proliferation and invasion in diffuse large B cell lymphoma [J]. Epigenetics, 2021, 16(1): 28-44.
- [6] 彭书旺, 段姗姗. miR-518a-5p 靶向 HDAC2 调控甲状腺鳞癌细胞 SW579 凋亡的实验研究 [J]. 中国现代普通外科进展, 2022, 25(1): 18-22.
- PENG S W, DUAN S S. Experimental study of mir-518a-5p targeting HDAC2 to regulate apoptosis of thyroid squamous cell carcinoma SW579 [J]. Chin J Curr Adv Gen Surg, 2022, 25(1): 18-22.
- [7] TAVARES M O, MILAN T M, BIGHETTI-TREVISAN R L, et al. Pharmacological inhibition of HDAC6 overcomes cisplatin chemoresistance by targeting cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma [J]. J Oral Pathol Med, 2022, 51(6): 529-537.
- [8] YOO J, JEON Y H, LEE D H, et al. HDAC6-selective inhibitors enhance anticancer effects of paclitaxel in ovarian cancer cells [J]. Oncol Lett, 2021, 21(3): 201.
- [9] DUDA J M, THOMAS S N. Interactions of histone deacetylase 6 with DNA damage repair factors strengthen its utility as a combination drug target in high-grade serous ovarian cancer [J]. ACS Pharmacol Transl Sci, 2023, 6(12): 1924-1933.
- [10] RICHARDSON D L, ESKANDER R N, O' MALLEY D M. Advances in ovarian cancer care and unmet treatment needs for patients with platinum resistance: a narrative review [J]. JAMA Oncol, 2023, 9(6): 851-859.
- [11] TURKISTANI S, SUGITA B M, FADDA P, et al. A panel of miRNAs as prognostic markers for African-American patients with triple negative breast cancer [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 861.
- [12] QIAN L, GUAN J, WU Y, et al. Upregulated circular RNA circ_0074027 promotes glioblastoma cell growth and invasion by regulating miR-518a-5p/IL17RD signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 510(4): 515-519.
- [13] WU Z, ZHANG F, HUANG S, et al. The novel angiogenesis regulator circFAM169A promotes the metastasis of colorectal cancer through the angiopoietin-2 signaling axis [J]. Aging, 2023, 15(16): 8367-8383.
- [14] VALENTINI E, DI MARTILE M, BRIGNONE M, et al. Bcl-2 family inhibitors sensitize human cancer models to therapy [J]. Cell Death Dis, 2023, 14(7): 441.
- [15] OLBROMSKI P J, BOGACZ A, BUKOWSKA M, et al. Analysis of the polymorphisms and expression levels of the BCL2 BAX and c-MYC genes in patients with ovarian cancer [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(22): 16309.
- [16] MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI M, OSTADIAN C, SAEI A A, et al. DNA damage response and repair in ovarian cancer: Potential targets for therapeutic strategies [J]. DNA Repair, 2019, 80: 59-84.
- [17] REN Y, YANG P, LI C, et al. Ionizing radiation triggers mitophagy to enhance DNA damage in cancer cells [J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 267.
- [18] QIU L, XU W, LU X, et al. The HDAC6-RNF168 axis regulates H2A/H2A. X ubiquitination to enable double-strand break repair [J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51(17): 9166-9182.
- [19] LU D, QU L, WANG C, et al. Harmine-based dual inhibitors targeting histone deacetylase (HDAC) and DNA as a promising strategy for cancer therapy [J]. Bioorg Chem, 2022, 120: 105604.
- [20] YANG W B, WU A C, HSU T I, et al. Histone deacetylase 6 acts upstream of DNA damage response activation to support the survival of glioblastoma cells [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(10): 884.

[收稿日期]2024-09-18