miR-506-3p 对卵巢癌细胞化学治疗敏感性的影响

李 燚，邵 琳*
（山东省立第三医院妇科，山东济南 250031）

摘要：目的 探讨 miR-506-3p 对卵巢癌（ovarian cancer，OC）细胞化学治疗敏感性的影响及其作用机制。**方法** 用定量反转录聚合酶链反应法检测 miR-506-3p 和永离有丝分裂基因 A 相关激酶 6（never in mitosis gene A-related kinase 6，NEK6）在 OC 顺铂（cisplatin，DDP）耐药细胞系（SKOV3/DDP、A2780/DDP 和 HeyA8/DDP）及其亲本细胞系（SKOV3、A2780 和 HeyA8）中的表达水平；用 Lipofectamine 2000 分别转染构建 miR-506-3p 过表达 SKOV3/DDP 细胞和 DDP 敏感 SKOV3 细胞；四唑盐比色法测定各转染组 SKOV3/DDP 细胞和敏感 SKOV3 细胞的存活率及半数抑制浓度（half inhibitory concentration，IC_{50}）；TargetScan 预测 miR-506-3p 的潜在靶基因，双荧光素酶实验进行验证；免疫印迹法测定转染后 NEK6 蛋白的表达水平。**结果** OC 耐药细胞系中 miR-506-3p 低表达，NEK6 高表达。转染 miR-506-3p 模拟物（mimic）可使 SKOV3/DDP 细胞和敏感 SKOV3 细胞存活率、IC_{50} 值显著降低；敏感 SKOV3 细胞存活率、IC_{50} 值低于 SKOV3/DDP 细胞，DDP 对 SKOV3/DDP 细胞 IC_{50} 值是敏感 SKOV3 细胞的 2.1 倍。共转染 miR-506-3p mimic 和 LV-NEK6 逆转了 miR-506-3p mimic 单独转染对 SKOV3/DDP 细胞化学治疗敏感性的影响。说明 NEK6 是 miR-506-3p 的潜在靶基因。miR-506-3p 负向调控 NEK6 蛋白的表达。**结论** miR-506-3p 通过靶向抑制 NEK6 表达增加了 OC 耐药细胞的化学治疗敏感性。

关键词：卵巢癌；miR-506-3p；永离有丝分裂基因 A 相关激酶 6（NEK6）；顺铂；化学治疗敏感性
中图分类号：R737.9 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2022）05-0533-09
DOI：10.13683/j.wph.2022.05.008

Effect of miR-506-3p on chemosensitivity of ovarian cancer cells

LI Yi, SHAO Lin*
(*Department of Gynecology, The Third Shandong Provincial Hospital, Ji'nan 250031, Shandong Province, China*)

Abstract: ***Objective*** To investigate the effect of miR-506-3p on the chemosensitivity of ovarian cancer (OC) cells and its mechanism. ***Methods*** MiR-506-3p and never in mitosis gene A-related kinase 6 (NEK6) were detected by quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction (qRT-PCR) in cisplatin (DDP) resistant OC cell lines (SKOV3/DDP, A2780/DDP, HeyA8/DDP) and their parent cell lines (SKOV3, A2780 , HeyA8). Lipofectamine 2000 was used to transfect miR-506-3p overexpressed SKOV3/DDP cells and DDP sensitive SKOV3 cells, respectively. The survival rate and half inhibitory concentration (IC_{50}) of SKOV3/DDP cells and sensitive SKOV3 cells in each transfection group were measured by tetrazolium salt colorimetry (MTT). TargetScan predicted potential target genes of miR-506-3p, verified by double luciferase experiment. Western blott (WB) was used to determine the expression level of NEK6 protein after transfection. ***Results*** The expression of miR-506-3p was low and NEK6 was high in OC drug-resistant cell lines. Transfection with miR-506-3p mimic significantly reduced the survival rate and IC_{50} value of SKOV3/DDP cells and SKOV3 sensitive cells. The survival rate and IC_{50} value of sensitive SKOV3 cells were lower than that of SKOV3/DDP cells, and the IC_{50} value of DDP on SKOV3/DDP cells was 2.1 times higher than that of sensitive SKOV3 cells. Co-transfection of miR-506-3p mimic and LV-NEK6 reversed the effect of miR-506-3p mimic alone on chemosensitivity of SKOV3/DDP cells. NEK6

收稿日期：2021-09-01；**修回日期：**2022-04-12
作者简介：李燚，副主任医师，研究方向：妇科肿瘤的基础研究。
通信作者：邵琳，副主任医师，研究方向：妇科肿瘤的基础研究。
基金项目：山东省医药卫生科技发展计划立项项目（2018WS283）；山东省交通厅课题（2018B25）

is a potential target gene of miR-506-3p. The results of WB showed that miR-506-3p negatively regulates NEK6 protein expression. ***Conclusion*** MiR-506-3p increase chemosensitivity of ovarian cancer resistant cells by targeting inhibition of NEK6 expression.

Key words: ovarian cancer; miR-506-3p; never in mitosis gene A-related kinase 6（NEK6）; cisplatin; chemosensitivity

卵巢癌（ovarian cancer，OC）是妇科常见的恶性肿瘤，致死率高，五年生存率仅 25% ～ 30%，而化学治疗耐药的发生是 OC 致死率高的主要原因[1]。顺铂（cisplatin，DDP）是化学治疗中的常用药物，然而治疗过程中肿瘤细胞对 DDP 耐药性的产生严重影响了其疗效[2]。因此，探讨 OC 化学治疗的耐药机制，寻找关键治疗靶点，增强肿瘤细胞对化学治疗药物的敏感性，对实现化学治疗耐药逆转具有重要的临床意义。

微 RNA（microRNA，miRNA）是一段长度仅有 18 ～ 24 bp 且高度保守的非编码 RNA 序列，通过与靶基因的 3'- 非翻译区（3'-untranslated regions，3'-UTR）结合，调控靶基因的表达，参与调控肿瘤细胞增殖、分化和凋亡等生物学过程，与肿瘤的发生发展及肿瘤细胞的耐药性密切相关[3]。miR-506-3p 是一个与肿瘤高度相关的 miRNA，位于 X 染色体，已发现其可在 OC[4]、乳腺癌[5]、前列腺癌[6]、骨肉瘤[7] 等恶性肿瘤中作为抑癌因子发挥调控作用。此外，有研究报道，miR-506-3p 参与肿瘤细胞耐药性的产生过程[8-10]，但目前尚无 miR-506-3p 参与 OC 细胞化学治疗耐药调控的研究，miR-506-3p 在 OC 化学治疗耐药中的作用及其机制尚不清楚。因此，本研究旨在探索 miR-506-3p 与 OC 耐药的关系，并阐明 miR-506-3p 调控 OC 细胞耐药的作用机制，对寻找克服耐药的关键靶点、逆转细胞耐药效应，增强化学治疗效果具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人 OC 细胞系 SKOV3、A2780、HeyA8，DDP 耐药细胞系 SKOV3/DDP、A2780/DDP、HeyA8/DDP 及 DDP 敏感细胞株 SKOV3（中国医学科学院肿瘤细胞库研究所）。胎牛血清、BCA 蛋白检测试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；聚偏二氟乙烯（polyvinylidene difluoride，PVDF）膜（美国 Thermo Fisher 公司）；定量反转录聚合酶链反应（quantitative reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction，qRT-PCR）试剂盒、逆转录试剂盒、TRIzol 试剂（Takara 公司）；脂质体 2000［宝生物工程（大连）有限公司］；RPMI 1640 培养基（美国 Gibco 公司）；MTT（美国 Sigma 公司）；内参 *U6*、*β-actin*（Boster 公司）；培养箱（上海跃进医疗器械厂）；RIPA 裂解液（美国 Cell Signaling Technology 生物公司）；miR-506-3p 模拟物（mimics）、pcDNA- 永离有丝分裂基因 A 相关激酶 6（never in mitosis gene A-related kinase 6，NEK6）过表达质粒（广州锐博生物技术有限公司）。兔抗人 NEK6 抗体（K21445）、鼠抗人甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（YT673）购自北京百奥莱博科技有限公司。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养与传代

在 37 ℃、5% CO_2、95% 相对湿度培养箱中常规培养。用 RPMI 1640 培养基并每隔 2 d 更换 1 次，待细胞融合度达到 80% ～ 90% 时传代培养。

1.2.2 细胞转染及分组

收集对数生长期的 SKOV3/DDP 细胞，使用胰蛋白酶消化，以 5×10^5 个 / 孔接种至 6 孔培养板中常规培养。待细胞生长至融合度达到 50% 时转染，参照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书将 miR-506-3p mimics、阴性对照（negative control，NC）mimics、miR-506-3p mimics ＋ NEK6 空载质粒（pcDNA）、miR-506-3p mimics ＋ NEK6 过表达质粒（pcDNA-

NEK6）分别转染至 SKOV3/DDP 细胞中，同时设置空白对照组（Blank）。转染完成后置 5% CO_2 培养箱中孵育，24 h 后检测转染效率，收集处于对数生长期的细胞用于后续试验。

1.2.3 qRT-PCR

使用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA，Nanodrop ND-1000 检测总 RNA 质量及浓度。使用 TaKaRa 反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板，TaKaRa 荧光定量试剂盒配制 20 μl 反应体系：SYBR Premix Ex Taq（2×）10 μl，正向（Forward，F）、反向（Reverse，R）引物各 0.8 μl，cDNA 2 μl，D_2O 6 μl，ROX Reference Dye or Dye Ⅱ（50×）0.4 μl，置实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增。反应条件为：95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 5 s，60 ℃退火 / 延伸 34 s，循环 40 次。以 *U6*/*β-actin* 为内参基因，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 miR-506-3p/NEK6 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

基因	引物序列
miR-506-3p	F：5'-TAAGGCACCCTTCTGAGTAGA-3'
	R：5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'
NEK6	F：5'-TTCCAACAACCTCTGCCACACC-3'
	R：5'-CACAGTCCTGCCTCGCCTTG-3'
U6	F：5'-TGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTC-3'
	R：5'-CCAGTCTCAGGGTCCGAGGTGTC-3'
β-actin	F：5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3'
	R：5'-CAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCA-3'

1.2.4 MTT

收集转染 24 h 后的各组细胞，胰蛋白酶消化，以 5×10^4 个 / 孔接种于 96 孔板中，分别用 0、4、8、12、16、20 μg/ml 的 DDP 处理，48 h 后加入 20 μl 5 g/L 的 MTT 试剂，继续培养 4 h，加入 150 μl 二甲亚砜，37 ℃振荡反应 10 min，测定 570 nm 处的光密度（optical density，OD）值。细胞存活率 /% = （$OD_{对照组}$ − $OD_{实验组}$）/$OD_{实验组}$ ×100%。药物对细胞的抑制率 /% = （1 − $OD_{实验组}$/$OD_{对照组}$）×100%，根据细胞抑制率及相对应的 DDP 浓度，计算 DDP 的半数抑制浓度（half inhibitory concentration，IC_{50}）。实验重复 3 次取平均值。

1.2.5 双荧光素酶实验

通过生物信息学软件 Target Scan 搜索 miR-506-3p 的潜在靶点，预测结果显示 NEK6 的 3'-UTR 可以与 miR-506-3p 结合。构建含有 NEK6 野生型（NEK6-wild type，NEK6-WT）或 NEK6 突变型（NEK6-mutant，NEK6-MUT）的双荧光素酶报告载体质粒，使用 Lipofectamine 2000 试剂，将 0.5 μg 含有 NEK6-WT 或 NEK6-MUT 的报告质粒与 miR-506-3p mimics 或 mimics NC 共转染至 SKOV3 细胞中。常规培养 48 h 后，使用荧光素酶报告基因测定系统检测萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性，相对荧光素酶活性以二者的比值计算。实验重复 3 次取平均值。

1.2.6 免疫印迹（western blot，WB）检测

收集转染 24 h 后的各组细胞，裂解提取总蛋白，采用 BCA 检测试剂盒测定总蛋白浓度。取 30 μg 蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白，电泳结束后将蛋白转至 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉封闭液封闭 1 h，洗膜 3 次，每次 10 min，加入一抗稀释液，NEK6 和 GAPDH 一抗均按 1 ∶ 1 000 稀释，4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，加入辣根过氧化酶标记的二抗，室温孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。加入 ECL 发光显影液，蛋白成像仪拍照记录条带，Quantity One 软件分析，以目的蛋白灰度值 / 内参灰度值来计算目的蛋白相对表达量。实验重复 3 次取平均值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析，每个实验均重复 3 次，数据以（均数 ± 标准差）表示，两组间比较采用 *t* 检验，多组比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-*t* 检验；以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-506-3p 与 NEK6 在 OC 耐药细胞中的表达

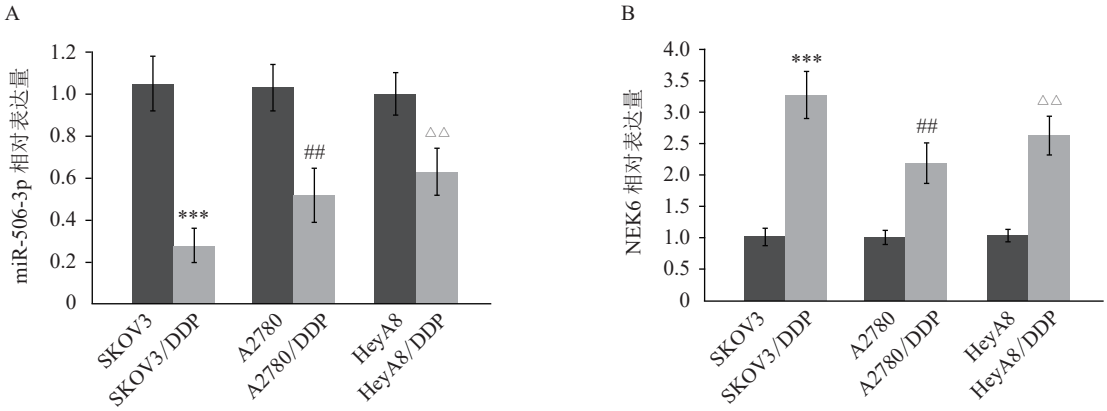
qRT-PCR 结果显示，miR-506-3p 在 OC 耐药细胞系（SKOV3/DDP、A2780/DDP 和 HeyA8/DDP）中的表达水平显著低于其亲本细胞系（SKOV3、A2780 和 HeyA8）（图 1A，$P < 0.01$）；NEK6 在 OC 耐药细胞中的表达水平高于 OC 细胞（图 1B，$P < 0.01$），表现出相反的表达模式，且 OC 耐药细胞系 SKOV3/DDP 水平差异最大（$P < 0.001$）。由此得出 OC 耐药细胞中 miR-506-3p 显著低表达、NEK6 显著高表达，表明 miR-506-3p 表达降低或者 NEK6 表达升高可能是 OC 细胞对 DDP 产生耐药的原因。

2.2 过表达 miR-506-3p 对 SKOV3/DDP 细胞生长及其化学治疗敏感性分析

利用脂质体转染技术将 miR-506-3p mimics 及 mimics NC 分别转染至 SKOV3/DDP 细胞及 DDP 敏感细胞 SKOV3 中，qRT-PCR 检测转染效率显示，miR-506-3p mimics 组 SKOV3/DDP 细胞和敏感 SKOV3 细胞中 miR-506-3p 表达水平显著高于对照组和 mimics NC 组，说明转染成功（图 2，$P < 0.001$）。MTT 法检测 SKOV3/DDP 细胞和敏感 SKOV3 细胞对 DDP 的敏感性，结果显示随着 DDP 浓度增加，SKOV3/DDP 细胞和敏感 SKOV3 细胞存活率均逐渐下降，miR-506-3p mimics 组细胞存活率显著低于对照组和 mimics NC 组（图 3，$P < 0.01$），且敏感 SKOV3 细胞存活率下降速率大于 SKOV3/DDP 细胞，说明 SKOV3/DDP 细胞对 DDP 敏感性更低，过表达 miR-506-3p 能抑制耐药细胞和敏感细胞的生长。MTT 结果进一步显示，DDP 对 miR-506-3p mimics 组 SKOV3/DDP 细胞 IC_{50} 值为 16.25±0.88 μg/ml，显著低于对照组的（29.36±2.04）和 mimics NC 组的（29.15±2.19）μg/ml（图 4，$P < 0.01$）；DDP 对 miR-506-3p mimics 组敏感 SKOV3 细胞 IC_{50} 值为（7.24±0.72）μg/ml，显著低于对照组的（14.06±2.37）和 mimics NC 组的（13.87±2.52）μg/ml（图 4，$P < 0.01$）；DDP 对 SKOV3/DDP 细胞 IC_{50} 值约是敏感 SKOV3 细胞的 2.1 倍。由此可见，过表达 miR-506-3p 能抑制 SKOV3/DDP 细胞生长，增加 SKOV3/DDP 细胞对 DDP 的敏感性，从而降低其耐药性。

2.3 miR-506-3p 靶向抑制 NEK6 表达

TargetScan 在线预测发现，*NEK6* 3'-UTR 上存在 miR-506-3p 的潜在结合位点（图 5），*NEK6* 可能是 miR-506-3p 的靶基因。通过双荧光素酶报告基因实验进行验证，结果显示，转染 miR-506-3p mimics 显

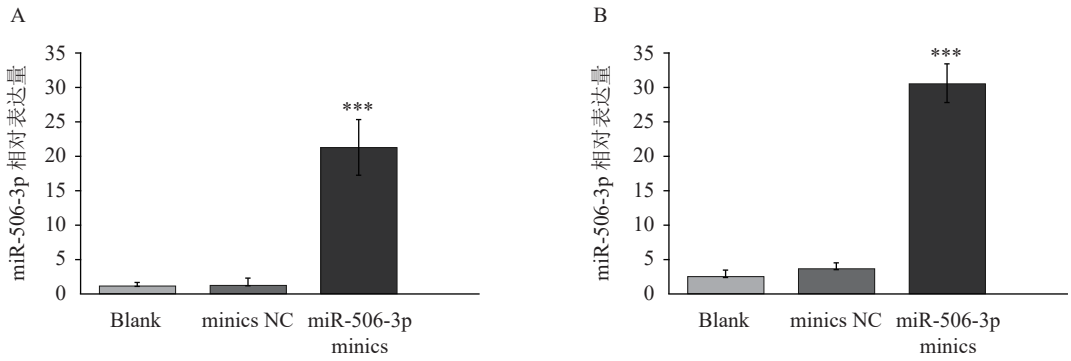


注：与 SKOV3 比较，$^{***}P < 0.001$；与 A2780 比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与 HeyA8 比较，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$

Note: *vs* SKOV3, $^{***}P < 0.001$; *vs* A2780, $^{\#\#}P < 0.01$; *vs* HeyA8, $^{\triangle\triangle}P < 0.01$

图 1 miR-506-3p（A）与 NEK6（B）在 OC 耐药细胞中的表达水平

Figure 1 Expression levels of miR-506-3p（A）and NEK6（B）in drug-resistant ovarian cancer cells

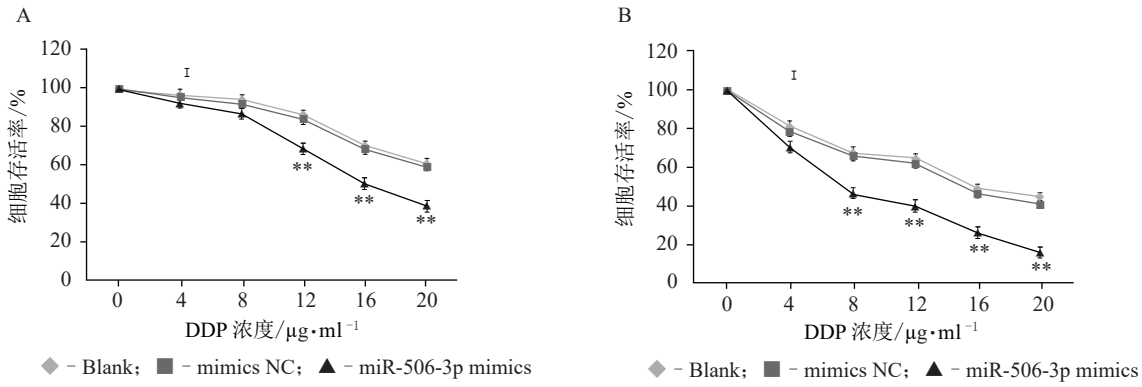


注：与对照组和 mimics NC 组比较，***$P < 0.001$

Note: *vs* control group and mimics NC group, ***$P < 0.001$

图 2 SKOV3/DDP 细胞（A）及 DDP 敏感 SKOV3 细胞（B）的转染效率

Figure 2 Transfection efficiencies of SKOV3/DDP cells (A) and DDP sensitive SKOV3 cells (B)



注：与对照组和 mimics NC 组比较，**$P < 0.01$

Note: *vs* control group and mimics NC group, **$P < 0.01$

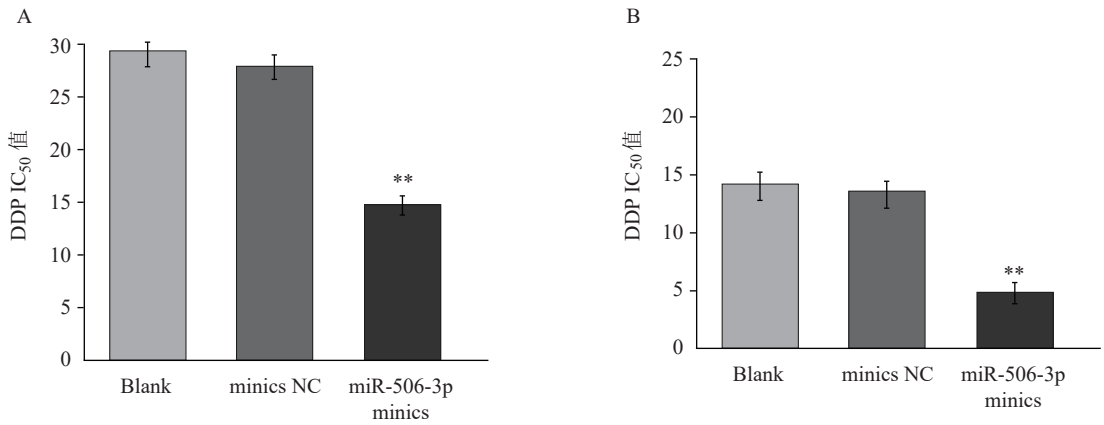
图 3 SKOV3/DDP 细胞（A）及 DDP 敏感 SKOV3 细胞（B）存活率

Figure 3 Survival rates of SKOV3/DDP cells (A) and DDP sensitive SKOV3 cells (B)

著降低了 NEK6-WT 质粒的荧光素酶活性（$P < 0.01$），而对 NEK6-MUT 质粒荧光素酶活性无显著影响（图 6，$P > 0.05$），表明 *NEK6* 是 miR-506-3p 的靶基因。WB 结果显示，miR-506-3p mimics 组 SKOV3/DDP 细胞中 NEK6 蛋白的表达水平显著低于对照组和 mimics NC 组（图 7，$P < 0.01$），表明 miR-506-3p 可以负向调控 NEK6 蛋白表达。由此可见，miR-506-3p 靶向抑制 NEK6 表达。

2.3 miR-506-3p 靶向抑制 NEK6 表达增加 SKOV3/DDP 细胞化学治疗敏感性

利用脂质体转染技术将 miR-506-3p mimic ＋ pcDNA 及 miR-506-3p mimic ＋ pcDNA-NEK6 共转染至 SKOV3/DDP 细胞中，MTT 法检测 SKOV3/DDP 细胞对 DDP 的敏感程度，结果显示，与 miR-506-3p mimic ＋ pcDNA 组相比，miR-506-3p mimic ＋ pcDNA-NEK6 组细胞的存活率显著升高（图 8，$P < 0.05$），IC_{50} 值显著增加（图 9，$P < 0.05$）。上述结果表明，NEK6 过表达会促进 SKOV3/DDP 细胞生长，降低 SKOV3/DDP 细胞对 DDP 的敏感性，逆转 miR-506-3p 过表达对 SKOV3/DDP 细胞化学治疗敏感性的促进作用。因此，miR-506-3p 能够通过靶向抑制 NEK6 的表达增加 SKOV3/DDP 细胞的化学治



注：与对照组和 mimics NC 组比较，**$P < 0.01$

Note: *vs* control group and mimics NC group, **$P < 0.01$

图 4 DDP 对 SKOV3/DDP 细胞（A）及 DDP 敏感 SKOV3 细胞（B）的 IC_{50} 值

Figure 4 IC_{50} values of DDP on SKOV3/DDP cells (A) and DDP sensitive SKOV3 cells (B)

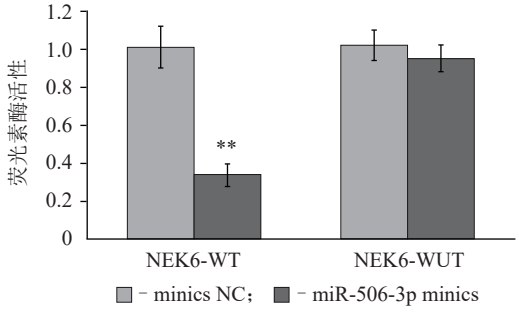
WT-NEK6 5'-…AAGCCAGCACCACUUUGCCUUAC…-3'

hsa-miR-506-3p 3'-…AGAUGAGUCUUCCCACGGAAUG…-5'

MUT-NEK6 5'-…AAGCCAGCACCACUUUGGGCCAC…-3'

图 5 miR-506-3p 与 NEK6 的结合位点

Figure 5 The binding site of miR-506-3p to NEK6



注：与 mimics NC 组比较，**$P < 0.01$

Note: *vs* mimics NC group, **$P < 0.01$

图 6 双荧光素酶报告基因检测荧光素酶活性

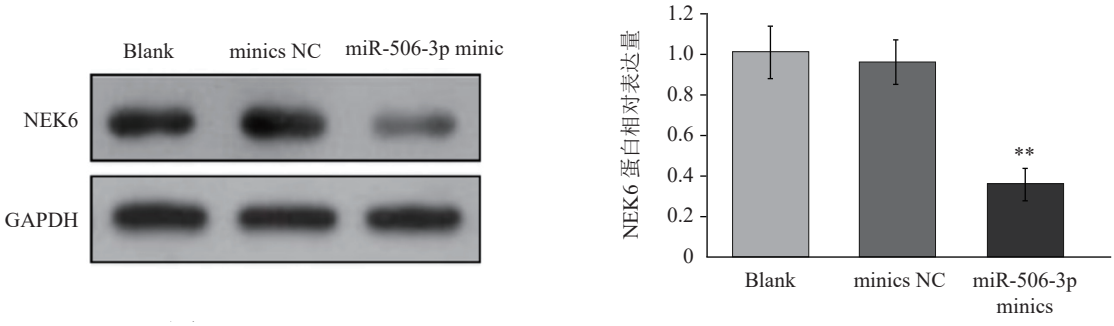
Figure 6 Luciferase activity detected by double luciferase reporter gene

疗敏感性。

3 讨论

OC 是女性生殖系统常见的肿瘤之一，死亡率居妇科肿瘤首位，对女性的生命健康造成严重威胁[11]。因卵巢位于盆腔深部，发病隐匿，确诊时大部分患者已属于中晚期，彻底的 OC 细胞减灭术及术后以铂类（DDP 或卡铂）为基础的辅助化学治疗是 OC 的标准治疗手段之一[12]。但因其化学治疗耐药的发生，几乎所有患者均会出现疾病复发。由此可见，化学治疗耐药的产生是 OC 治疗中面对的主要挑战。因此，攻克化学治疗耐药这一难题，寻找新的治疗方法及药物，提高其对化学治疗的敏感性，是 OC 研究的重点。

肿瘤耐药与多种因素相关，miRNA 参与调控细胞的生物学行为与肿瘤细胞耐药密切相关。研究发现，miR-506 在肿瘤耐药患者组织及耐药细胞中异常低表达，其表达缺失可能是肿瘤化学治疗产生耐药的重要因素。Tong 等[13] 在结肠癌喜树碱耐药细胞中鉴定出 77 个差异表达的 miRNA，其中 miR-506 异常低表达。Zhou 等[14] 研究发现，结肠癌耐化学治疗药物患者肿瘤组织中 miR-506 低表达，且低 miR-506 表达组五年生存率也较低。NEK6 作为细胞周期调控的正性蛋白，主要存在于微管结构中，调节微管的功能，促进细胞有丝分裂。NEK6 在多种恶性肿瘤中高表达，其异常会导致整个细胞周期的调控异

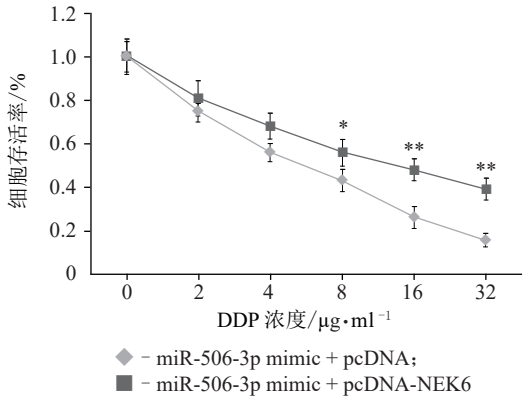


注：与对照组和 mimics NC 组比较，$^{**}P < 0.01$

Note: *vs* control group and mimics NC group, $^{**}P < 0.01$

图 7 NEK6 的相对表达水平

Figure 7 The relative expression of NEK6

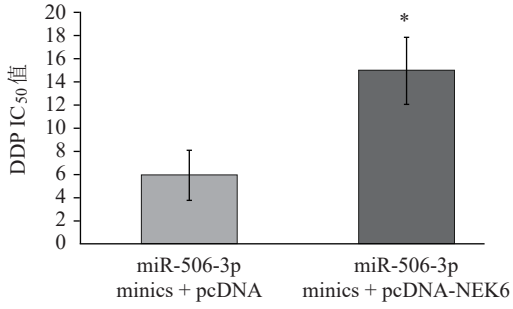


注：与 miR-506-3p mimic + pcDNA 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$

Note: *vs* miR-506-3p mimic + pcDNA group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

图 8 miR-506-3p 靶向调控 *NEK6* 对 SKOV3/DDP 细胞存活率的影响

Figure 8 Effect of miR-506-3p targeted regulation of *NEK6* on the survival rate of SKOV3/DDP cells



注：与 miR-506-3p mimic + pcDNA 组比较，$^{*}P < 0.05$

Note: *vs* miR-506-3p mimic + pcDNA group, $^{*}P < 0.05$

图 9 miR-506-3p 靶向调控 *NEK6* 对 SKOV3/DDP 细胞的 IC_{50} 值

Figure 9 IC_{50} value of miR-506-3p taegeted regulation of *NEK6* on SKOV3/DDP cell

常，造成细胞的非正常增殖，进而导致肿瘤的发生、发展[15]。NEK6 在肿瘤细胞耐药中同样也发挥了重要作用。Donato 等[16]研究发现，NEK6 和低氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor，HIF)1α 与耐药性的细胞骨架通路合作，共同推动浆液性 OC 的预后。研究发现，抑制 NEK6 功能可使肿瘤细胞对血清减少或抗肿瘤药物治疗早衰更为敏感[17]；而 NEK6 过表达可使抗肿瘤药物喜树碱和阿霉素诱导的肿瘤细胞对早衰产生抗药性，说明靶向 NEK6 可能是肿瘤治疗的有效策略[18]。本研究结果显示，miR-506-3p 在 DDP 耐药 OC 细胞中异常低表达，而 NEK6 异常高表达，表明 miR-506-3p 和 NEK6 在 OC 耐药现象产生过程中可能扮演着至关重要的角色，miR-506-3p 表达的降低或者 NEK6 表达的升高可能是 OC 细胞对 DDP 产生耐药的原因，可作为 OC 治疗的潜在靶点。

miR-506 在临床应用上的前景十分广阔，多项研究表明上调 miR-506 表达可以增加耐药细胞对化学治疗药物的敏感性，从而逆转耐药，改善预后。Tong 等[13]研究发现，过表达 miR-506 通过抑制过氧化物酶体增殖物激活受体 α(peroxisome proliferator-activated receptor α，PPARα) 促进结

肠癌细胞对喜树碱的耐受。Zhou 等[14]研究发现，miR-506 过表达能通过下调 Wnt/β-catenin 途径抑制多药耐药基因 1(multidrug resistance 1，MDR1)/P-糖蛋白 (P-glycoprotein，P-gp) 表达，从而增强结肠癌耐药细胞的奥沙利铂敏感性。Li 等[19]研究发现，miR-506 能增加胰腺癌化学治疗敏感性。本研究将 miR-506-3p mimic 转染至 OC 的 DDP 耐药细胞及敏感细胞中，使 miR-506-3p 过表达，结果显示过表达 miR-506-3p 显著降低了 DDP 耐药细胞和敏感细胞的存活率及 IC_{50} 值，且敏感细胞存活率更低，DDP 对耐药细胞 IC_{50} 值是敏感细胞的 2.1 倍，表明耐药细胞对 DDP 的敏感性低，miR-506-3p 过表达可提高 OC 耐药细胞对 DDP 的敏感性。由此可见，通过调控 miR-506-3p 过表达，可以有效克服 OC 耐药细胞对 DDP 的抗性，从而逆转耐药，为临床上克服 OC 细胞 DDP 耐药和增强化学治疗疗效提供了一个新的干预靶点。

在哺乳动物等真核生物中，miRNA 与其靶基因的 3'-UTR 通过不完全互补结合来抑制靶基因表达，正是因为这种不完全互补方式使得一个 miRNA 可靶向调控多个基因表达。因此，寻找与 miR-506-3p 调控相关的下游基因，是探索 miR-506-3p 调控 OC 化学治疗耐药机制的重要途径。Liu 等[20]发现，miR-506 通过直接靶向 OC 的周期蛋白依赖性激酶 4(cyclin-dependent kinases，CDK4)/6- 叉头框蛋白 M1(6-forkhead box M1，6-FOXM1) 轴抑制增殖并诱导衰老。Lei 等[21]发现，lncRNA MALAT1 通过调控 miRNA-506 调节 OC 进展。本研究通过 TargetScan 预测 miR-506-3p 的靶基因，发现 NEK6 是 miR-506-3p 的潜在靶基因，并通过双荧光素酶实验予以证实，证实 miR-506-3p 负向调控 NEK6 蛋白表达。为了进一步研究 miR-506-3p 调控 OC 细胞耐药的分子机制，将 miR-506-3p mimic 和 pcDNA-NEK6 共转染至 OC 的 DDP 耐药细胞中，结果发现，NEK6 过表达可部分逆转 miR-506-3p 过表达对 SKOV3/DDP 细胞化学治疗敏感性的促进作用，表明 miR-506-3p 通过 NEK6 调控 OC 耐药细胞的化学治疗敏感性。综合以上结果，miR-506-3p 能够通过靶向抑制 NEK6 的表达增加 OC 耐药细胞的化学治疗敏感性，从而逆转耐药，阐明了 miR-506-3p 逆转 OC 化学治疗耐药的具体分子机制，为新的分子治疗靶点的开发提供了理论基础。

4 结论

OC 耐药细胞中 miR-506-3p 低表达，NEK6 高表达；miR-506-3p 通过靶向抑制 NEK6 表达增加 OC 耐药细胞的化学治疗敏感性，从而逆转耐药，有望成为 OC 基因治疗的新靶点。

参考文献：

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[2] Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, *et al*. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes[J]. Pharmacol Rev, 2012, 64(3): 706-721.

[3] Calin GA. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale[J]. Cancer Res, 2006, 66(15): 7390-7394.

[4] Wang Y, Lei X, Gao CY, *et al*. MiR-506-3p suppresses the proliferation of ovarian cancer cells by negatively regulating the expression of MTMR6[J]. J Biosci, 2019, 44(6): 126.

[5] Saad El Din G, Youness RA, Assal RA, *et al*. 87P-Mir-506-3p synergistically represses breast cancer progression through altering cell cycle regulators[J]. Ann Oncol, 2018, 29(6): 28-33.

[6] Hu CY, You P, Zhang J, *et al*. MiR-506-3p acts as a novel tumor suppressor in prostate cancer through targeting GALNT4[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(12): 5133-5138.

[7] Wang D, Bao F, Teng Y, *et al*. MicroRNA-506-3p initiates mesenchymal-to-epithelial transition and suppresses autophagy in osteosarcoma cells by directly targeting SPHK1[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2019, 83(5): 836-844.

[8] 童锦禄, 徐锡涛, 朱明明, 等. miR-506在人结肠癌羟基喜树碱多药耐药中的功能研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2010, 19(7): 626-630.

[9] Liu G, Yang D, Rupaimoole R, *et al*. Augmentation of response to chemotherapy by microRNA-506 through regulation of RAD51 in serous ovarian cancers[J]. J Natl Cancer Inst, 2015, 107(7): djv108.

[10] 董小瑛. MiR-506调控EZH2-β-catenin信号通路对浆液性卵巢癌药物敏感性的影响[D]. 天津: 天津医科大学, 2017.

[11] Ali AT. Towards prevention of ovarian cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2018, 18(6): 522-537.

[12] MarkmanIii MG, Markman M. Primary ovarian cancer chemotherapy: current standards of care[J]. Br J Cancer, 2003, 89(S3): S3-S8.

[13] Tong JL, Zhang CP, Nie F, *et al*. MicroRNA 506 regulates expression of PPAR alpha in hydroxycamptothecin-resistant human colon cancer cells[J]. FEBS Lett, 2011, 585(22): 3560-3568.

[14] Zhou H, Lin C, Zhang Y, *et al*. MiR-506 enhances the sensitivity of human colorectal cancer cells to oxaliplatin by suppressing MDR1/P-gp expression[J]. Cell Prolif, 2017, 50(3): e12341.

[15] Cao XL, Xia YF, Yang JL, *et al*. Clinical and biological significance of never in mitosis gene A-related kinase 6(NEK6) expression in hepatic cell cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2012, 18(2): 201-207.

[16] Donato MD, Fanelli M, Mariani M, *et al*. NEK6 and Hif-1α cooperate with the cytoskeletal gateway of drug resistance to drive outcome in serous ovarian cancer[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(6): 1862-1877.

[17] Jee HJ, Kim HJ, Kim AJ, *et al*. The inhibition of NEK6 function sensitizes human cancer cells to premature senescence upon serum reduction or anticancer drug treatment[J]. Cancer Lett, 2013, 335(1): 175-182.

[18] Jee HJ, Kim HJ, Kim AJ, *et al*. NEK6 suppresses the premature senescence of human cancer cells induced by camptothecin and doxorubicin treatment[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 408(4): 669-673.

[19] Li J, Wu H, Li W, *et al*. Downregulated miR-506 expression facilitates pancreatic cancer progression and chemoresistance via SPHK1/Akt/NF-κB signaling[J]. Oncogene, 2016, 35(42): 5501-5514.

[20] Liu G, Sun Y, Ji P, *et al*. MiR-506 suppresses proliferation and induces senescence by directly targeting the CDK4/6-FOXM1 axis in ovarian cancer[J]. J Pathol, 2014, 233(3): 308-318.

[21] Lei R, Xue M, Zhang L, *et al*. Long noncoding RNA MALAT1-regulated microRNA 506 modulates ovarian cancer growth by targeting iASPP[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 35-46.

（编辑：沈佳婕）