

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research丹皮酚通过调控 *miR* - 128 - 3p/NEK2 信号轴
对卵巢癌细胞上皮间质转化及内质网应激
诱导的细胞凋亡影响的研究Research of paeonol influences the epithelial - mesenchymal transition in ovarian
cancer cells and endoplasmic reticulum stress - induced apoptosis by regulating the
miR - 128 - 3p/NEK2 signaling axis赵贝贝^{1a}, 滑 天^{1b}, 王瑞敏^{1a},
王晓慧^{1a}(1. 邢台市人民医院 a. 妇四科; b. 妇五科, 河北
邢台 054000)ZHAO Bei - bei^{1a}, HUA Tian^{1b},
WANG Rui - min^{1a},
WANG Xiao - hui^{1a}(1. a. Fourth Gynaecology Department;
b. Fifth Gynaecology Department,
Xingtai People's Hospital, Xingtai
054000, Hebei Province, China)作者简介: 赵贝贝 (1990 -), 女, 主治医师, 主要
从事妇科肿瘤方面的临床工作和
研究通信作者: 滑天, 主任医师, 博士生导师
MP: 13931941630
E - mail: zhb4423@163.com

摘要:目的 探究丹皮酚(PAE)通过调控微小RNA-128-3p(*miR*-128-3p)/永离有丝分裂基因A相关激酶2(NEK2)信号轴对卵巢癌细胞上皮间质转化(EMT)及内质网应激诱导的细胞凋亡的影响。方法 将SKOV3细胞分为SKOV3组(正常培养)、PAE组(4 mmol·L⁻¹ PAE处理)、inhibitor-NC组(转染*miR*-128-3p inhibitor 阴性对照)、*miR*-128-3p inhibitor组(转染*miR*-128-3p inhibitor)、si-NC组(转染si-NEK2 阴性对照)、si-NEK2组(转染si-NEK2)、PAE+inhibitor-NC组(基于PAE组,转染*miR*-128-3p inhibitor 阴性对照)、PAE+*miR*-128-3p inhibitor组(基于PAE组,转染*miR*-128-3p inhibitor)、PAE+*miR*-128-3p inhibitor+si-NC组(基于PAE组,共转染*miR*-128-3p inhibitor和si-NEK2 阴性对照)和PAE+*miR*-128-3p inhibitor+si-NEK2组(基于PAE组,共转染*miR*-128-3p inhibitor和si-NEK2)。用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测mRNA相对表达水平;用免疫荧光法检测NEK2蛋白的阳性表达;用蛋白质印迹法检测相关蛋白的相对表达水平。结果 SKOV3组、PAE组、PAE+inhibitor-NC组和PAE+*miR*-128-3p inhibitor组的*miR*-128-3p相对表达水平分别为1.00±0.12、2.34±0.27、2.30±0.29和1.19±0.21, NEK2 mRNA相对表达水平分别为1.00±0.13、0.58±0.09、0.61±0.12和0.93±0.18, NEK2的阳性表达分别为1.00±0.11、0.29±0.05、0.31±0.06和0.94±0.17; SKOV3组、PAE组、PAE+inhibitor-NC组、PAE+*miR*-128-3p inhibitor组、PAE+*miR*-128-3p inhibitor+si-NC组和PAE+*miR*-128-3p inhibitor+si-NEK2组的E-钙黏蛋白(*E-cadherin*) mRNA相对表达水平分别为1.00±0.12、2.25±0.29、2.27±0.34、1.30±0.21、1.32±0.20和2.03±0.35, N-钙黏蛋白(*N-cadherin*) mRNA相对表达水平分别为1.00±0.14、0.60±0.09、0.63±0.12、0.92±0.17、0.94±0.18和0.67±0.13, 波形蛋白(*Vimentin*) mRNA相对表达水平分别为1.00±0.13、0.62±0.09、0.66±0.11、0.90±0.17、0.92±0.18和0.71±0.13, 激活转录因子4(ATF4)蛋白相对表达水平分别为1.00±0.11、3.22±0.57、3.31±0.60、1.51±0.24、1.49±0.21和2.97±0.44, CAAT区/增强子结合蛋白(C/EBP)同源蛋白(CHOP)相对表达水平分别为1.00±0.14、3.85±0.47、3.62±0.41、1.31±0.17、1.28±0.17和3.26±0.57, 切割型半胱天冬酶-3(Cleaved-caspase-3)蛋白相对表达水平分别为1.00±0.13、4.52±0.67、4.61±0.71、1.67±0.26、1.69±0.31和4.11±0.76, PAE组的上述指标与SKOV3组比较; PAE+*miR*-128-3p inhibitor组的上述指标与PAE+inhibitor-NC组比较; PAE+*miR*-128-3p inhibitor+si-NEK2组的上述指标与PAE+*miR*-128-3p inhibitor+si-NC组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 PAE对卵巢癌具有抑制EMT, 促进内质网应激诱导的细胞凋亡的作用,

该作用可能是通过上调 *miR-128-3p* 抑制 NEK2 表达实现的。

关键词:丹皮酚;微小核糖核酸-128-3p;永离有丝分裂基因A相关激酶2;卵巢癌;上皮间质转化;内质网应激

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.21.014

中图分类号:R737.31 **文献标志码:**A

文章编号:1001-6821(2025)21-3083-07

Abstract: Objective To investigate the effect of paeonol (PAE) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in ovarian cancer cells by regulating the microRNA-128-3p (*miR-128-3p*)/never in mitosis gene A-related kinase 2 (NEK2) signaling axis. **Methods** SKOV3 cells were divided into the following groups: SKOV3 group (normal culture), PAE group (4 mmol · L⁻¹ PAE treatment), inhibitor-NC group (transfected with *miR-128-3p* inhibitor negative control), *miR-128-3p* inhibitor group (transfected with *miR-128-3p* inhibitor), si-NC group (transfected with si-NEK2 negative control), si-NEK2 group (transfected with si-NEK2), PAE + inhibitor-NC group (based on the PAE group, transfected with *miR-128-3p* inhibitor negative control), PAE + *miR-128-3p* inhibitor group (based on the PAE group, transfected with *miR-128-3p* inhibitor), PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si-NC group (based on the PAE group, co-transfected with *miR-128-3p* inhibitor and si-NEK2 negative control) and PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si-NEK2 group (based on the PAE group, co-transfected with *miR-128-3p* inhibitor and si-NEK2). Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the relative expression levels of mRNA; immunofluorescence was used to detect the positive expression of NEK2 protein; Western blot was used to detect the relative expression levels of related proteins. **Results** The relative expression levels of *miR-128-3p* in SKOV3 group, PAE group, PAE + inhibitor-NC group and PAE + *miR-128-3p* inhibitor group were 1.00 ± 0.12, 2.34 ± 0.27, 2.30 ± 0.29 and 1.19 ± 0.21, respectively; the relative expression levels of *NEK2* mRNA were 1.00 ± 0.13, 0.58 ± 0.09, 0.61 ± 0.12 and 0.93 ± 0.18, respectively; the positive expression of NEK2 was 1.00 ± 0.11, 0.29 ± 0.05, 0.31 ± 0.06 and 0.94 ± 0.17, respectively; the relative expression levels of *E-cadherin* mRNA in SKOV3 group, PAE group, PAE + inhibitor-NC group, PAE + *miR-128-3p* inhibitor group, PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si-NC group and PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si-NEK2 group were 1.00 ± 0.12, 2.25 ± 0.29, 2.27 ± 0.34, 1.30 ± 0.21, 1.32 ± 0.20 and 2.03 ± 0.35, respectively; the relative expression levels of *N-cadherin* mRNA were 1.00 ± 0.14, 0.60 ± 0.09, 0.63 ± 0.12, 0.92 ± 0.17, 0.94 ± 0.18 and 0.67 ± 0.13, respectively; the relative expression levels of *Vimentin* mRNA were 1.00 ± 0.13, 0.62 ± 0.09, 0.66 ± 0.11, 0.90 ± 0.17, 0.92 ± 0.18 and 0.71 ± 0.13, respectively; the relative expression levels of activating transcription factor 4 (ATF4) protein were 1.00 ± 0.11, 3.22 ± 0.57, 3.31 ± 0.60, 1.51 ± 0.24, 1.49 ± 0.21 and 2.97 ± 0.44, respectively; the relative expression levels of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP) were 1.00 ± 0.14, 3.85 ± 0.47, 3.62 ± 0.41, 1.31 ± 0.17, 1.28 ± 0.17 and 3.26 ± 0.57, respectively; the relative expression levels of cleaved-caspase-3 were 1.00 ± 0.13, 4.52 ± 0.67, 4.61 ± 0.71, 1.67 ± 0.26, 1.69 ± 0.31 and 4.11 ± 0.76, respectively. The differences in the above indicators were statistically significant when comparing PAE group with SKOV3 group, PAE + *miR-128-3p* inhibitor group with PAE + inhibitor-NC group and PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si-NEK2 group with PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si-NC group (all *P* < 0.05). **Conclusion** PAE suppresses EMT and promotes endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in ovarian cancer cells, potentially by upregulating *miR-128-3p* to inhibit NEK2 expression.

Key words: paeonol; micro ribonucleic acid-128-3p; never in mitosis gene A-related kinase 2; ovarian cancer; epithelial-mesenchymal transition; endoplasmic reticulum stress

卵巢癌是发生于卵巢的恶性肿瘤性疾病,其发病率居妇科恶性肿瘤第3位,病死率居首位^[1]。因其解剖部位特殊、现有技术局限等因素导致筛查困难,且

早期多无明显临床症状,发现时已至中晚期,生存期因病情进展而减少。因此,深入研究卵巢癌的发病机制尤为重要。丹皮酚(paeonol, PAE)是一种酚类物

质,能抑制人卵巢癌细胞增殖并诱导其凋亡^[2]。卵巢癌组织和细胞中的微小 RNA - 128 - 3p (micro ribonucleic acid - 128 - 3p, *miR* - 128 - 3p) 表达明显下调,其过表达能够促进癌细胞凋亡,并对侵袭、迁移起到抑制效果^[3]。永离有丝分裂基因 A 相关激酶 2 (never in mitosis gene A - related kinase 2, *NEK2*) 与卵巢癌的肿瘤分期有关,同时其高表达也与卵巢癌患者预后不良有关^[4]。但 *miR* - 128 - 3p 与 *NEK2* 共同在卵巢癌中的作用还需进一步研究,本研究旨在分析 PAE 对 *miR* - 128 - 3p/*NEK2* 信号轴的调控,以及其在卵巢癌细胞中发挥的作用,以期为卵巢癌临床治疗提供理论基础。

材料与方法

1 材料

细胞 人正常卵巢上皮细胞 (IOSE80) 和人卵巢癌细胞 (SKOV3), 均购自武汉尚恩生物技术有限公司。

药品与试剂 PAE, 纯度: 99.97%, 规格: 每瓶 20 mg, 批号: G2027075, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产; *NEK2* 一抗、山羊抗兔二抗、激活转录因子 4 (activating transcription factor 4, *ATF4*) 一抗、CAAT 区/增强子结合蛋白 (CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP) 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP)、切割型半胱天冬酶 - 3 (cleaved - caspase - 3) 和辣根过氧化物酶标记的二抗, 均购自美国赛默飞世尔科技公司; RPMI - 1640 完全培养基, 上海中乔新舟生物科技有限公司生产; Trizol 总 RNA 提取试剂, 杭州昊鑫生物科技股份有限公司生产; 逆转录试剂盒, 上海优利科生命科学有限公司生产; SYBR Green 试剂盒, 上海经科化学科技有限公司生产; 5 - 乙炔基 - 2' - 脱氧尿苷 (5 - ethynyl - 2' - deoxyuridine, EdU) 试剂盒, 广州市锐博生物科技有限公司生产; 二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒, 上海沪震实业有限公司生产; 化学发光试剂盒, 北京百奥莱博科技有限公司生产; *miR* - 128 - 3p 抑制剂 (inhibitor)、*miR* - 128 - 3p 模拟物 (mimics) 及其阴性对照 (inhibitor - NC、mimics - NC)、siRNA 序列和引物序列, 均购自上海吉玛制药技术有限公司。

仪器 MCO - 15AC 细胞培养箱, 日本 SANYO 公司产品; Synergy TM HT 酶标仪, 美国 BIO TEK 公司产品; FM - 600 倒置荧光显微镜, 上海普丹光学仪器有限公司产品; StepOne Puls 实时荧光定量聚合酶链反

应 (quantitative real - time polymerase chain reaction, qRT - PCR) 仪, 美国 ABI 公司产品; Tetra Cell 电泳槽, 美国 BIO RAD 公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[5]

用 RPMI - 1640 培养基 (10% 胎牛血清、1% 青 - 链霉素), 于培养箱中培养, 后续实验及传代操作均采用处于对数生长期的细胞。

2.2 细胞分组与给药方法^[5]

IOSE80 组: IOSE80 细胞正常培养, 不做任何处理; SKOV3 细胞分为 SKOV3 组 (正常培养, 不做任何处理); PAE 组 (4 mmol · L⁻¹ PAE 处理); inhibitor - NC 组 (转染 *miR* - 128 - 3p inhibitor 阴性对照); *miR* - 128 - 3p inhibitor 组 (转染 *miR* - 128 - 3p inhibitor); si - NC 组 (转染 si - *NEK2* 阴性对照); si - *NEK2* 组 (转染 si - *NEK2*); PAE + inhibitor - NC 组 (基于 PAE 组, 转染 *miR* - 128 - 3p inhibitor 阴性对照); PAE + *miR* - 128 - 3p inhibitor 组 (基于 PAE 组, 转染 *miR* - 128 - 3p inhibitor); PAE + *miR* - 128 - 3p inhibitor + si - NC 组 (基于 PAE 组, 共转染 *miR* - 128 - 3p inhibitor 和 si - *NEK2* 阴性对照); PAE + *miR* - 128 - 3p inhibitor + si - *NEK2* 组 (基于 PAE 组, 共转染 *miR* - 128 - 3p inhibitor 和 si - *NEK2*)。siRNA 序列如下 si - NC: 5' - GACCACUCCAGGAGUAAUATT - 3'; si - *NEK2*: 5' - CUUUGGGCUAGCUAGAAUAAU - 3'。293T 细胞随机分为 4 组, 将 *NEK2* - 野生型 (wild type, WT)、*NEK2* - 突变型 (mutant type, MUT) 分别与 mimics - NC 和 *miR* - 128 - 3p mimics 共转染至 293T 细胞。

2.3 qRT - PCR 法检测 *miR* - 128 - 3p、*NEK2* mRNA 和上皮间质转化 (epithelial - mesenchymal transition, EMT) 相关因子的 mRNA 水平^[6]

进行 RNA 提取, 通过逆转录得到 cDNA, 并扩增, 以 *GAPDH* 和 *U6* 为内参, 目的 mRNA 相对表达水平按 2^{-ΔΔC_t} 法计算。引物序列如下, *miR* - 128 - 3p 上游: 5' - TGCGGCAGTGGTTTTACCCTATG - 3', 下游: 5' - CCAGTGCAGGGTCCGAGGT - 3'; *NEK2* 上游: 5' - TGCTTCGTGAAGTGAACATCC - 3', 下游: 5' - CCA - GAGTCAACTGAGTCATCACT - 3'; E - 钙黏蛋白 (*E - cadherin*) 上游: 5' - CGAGAGCTACACGT - TCACGG - 3', 下游: 5' - GGGTGTCCAGGGAAAAAT - AGG - 3'; N - 钙黏蛋白 (*N - cadherin*) 上游: 5' - TCAGGCGTCTGTAGAGGCTT - 3', 下游: 5' - ATGCA - CATCCTTCGATAAGACTG - 3'; 波形蛋白 (*Vimentin*)

上游:5' - GACAATGCGTCTCTGGCACGTCTT - 3', 下游:5' - TCCTCCGCCTCCTGCAGTTCTT - 3'; U6 上游:5' - GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT - 3', 下游:5' - CGATTACGAATTTGCGTGTTCAT - 3'; GAPDH 上游:5' - CGCTCTCTGCTCCTCCTGTTC - 3', 下游:5' - ATCCGTTGACTCCGACCTTCAC - 3'。

2.4 双荧光素酶法验证 *miR-128-3p* 和 *NEK2* 的靶向关系^[6]

用 GEPIA 2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn>) 数据库和 TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/) 数据库分析 *miR-128-3p* 和 *NEK2* 之间的关系。基于 2 者的结合序列构建 *NEK2-WT* 和 *NEK2-MUT* 重组质粒。将重组质粒分别与 *miR-128-3p* mimics 和 mimics-NC 共同转染到 293T 细胞。经过 48 h 培养, 再对各组荧光素酶活性进行测定。

2.5 EdU 实验法检测细胞 24 h 的增殖情况^[7]

各组细胞接种在 24 孔板, 培养 24 h 后, 加入适量 EdU 试剂, 按 EdU 细胞增殖检测试剂盒检测细胞 EdU 阳性率。

2.6 免疫荧光法检测 *NEK2* 蛋白的阳性表达^[7]

用甲醇固定细胞, 0.1 % Triton X-100 渗透细胞膜, 加入 *NEK2* 一抗(1:500), 4 ℃ 过夜, 洗涤, 添加按照 1:1 000 比例稀释的二抗, 孵育 2 h, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚染核, 在荧光显微镜下观察并采集图像。

2.7 蛋白质印迹法 (Western blot, WB) 检测内质网应激相关蛋白及凋亡蛋白的表达^[7]

加入裂解液裂解细胞, 提取蛋白样品, 对蛋白进行定量, 取蛋白 60 μg 上样, 经电泳、转膜, 分别与 ATF4 一抗、CHOP 和 Cleaved-caspase-3 (均 1:500), 4 ℃ 过夜。洗涤, 添加按照 1:1 × 10⁴ 比例稀释的二抗, 孵育 2 h。显影, 灰度值分析用 Image J 软件进行。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用独立样本 *t* 检验。

结 果

1 *miR-128-3p* 和 *NEK2* 在卵巢癌中的表达

用 GEPIA 2 数据库和 TargetScan 数据库筛查发现, *NEK2* 在卵巢癌组织中高表达, 且 *miR-128-3p* 和 *NEK2* 存在结合位点, 见图 1。IOSE80 组与 SKOV3 组的 *miR-128-3p* 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13 和 0.56 ± 0.08, *NEK2* mRNA 的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 和 3.17 ± 0.42, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 *P* < 0.001)。

2 *NEK2* 是 *miR-128-3p* 的靶点

miR-128-3p mimics 组的 *miR-128-3p* 相对表达水平相较于 mimics-NC 组显著升高, *NEK2* mRNA 相对表达水平显著降低 (均 *P* < 0.001)。与 mimics-NC 组相比, *NEK2-WT* 与 *miR-128-3p* mimics 共转染组中荧光素酶活性显著降低 (均 *P* < 0.001), 而 *NEK2-MUT* 与 *miR-128-3p* mimics 共转染组中荧光素酶活性在统计学上差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见表 1。

3 *miR-128-3p* inhibitor 和 si-*NEK2* 转染效率的验证

inhibitor-NC 组与 *miR-128-3p* inhibitor 组的 *miR-128-3p* 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 和 0.48 ± 0.07, 在统计学上差异有统计学意义 (*P* < 0.001)。si-NC 组与 si-*NEK2* 组的 *NEK2* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13 和 0.41 ± 0.08, 在统计学上差异有统计学意义 (*P* < 0.001)。

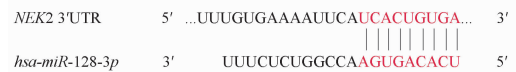


图 1 *miR-128-3p* 与永离有丝分裂基因 A (NIMA) 相关激酶 2 (*NEK2*) 的靶向关系

Figure 1 Binding site relationship between *miR-128-3p* and never in mitosis gene A-related kinase 2 (*NEK2*)

表 1 各组细胞中 *miR-128-3p* 和永离有丝分裂基因 A 相关激酶 2 (*NEK2*) mRNA 相对表达水平及荧光素酶相对活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of relative expression levels of *miR-128-3p* and never in mitosis gene A-related kinase 2 (*NEK2*) mRNA, and relative luciferase activity in the different cell groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	<i>miR-128-3p</i>	<i>NEK2</i> mRNA	<i>NEK2-WT</i>	<i>NEK2-MUT</i>
mimics-NC	8	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.09
<i>miR-128-3p</i> mimics	8	4.49 ± 0.57 ***	0.45 ± 0.08 ***	0.53 ± 0.12 ***	0.98 ± 0.12

mimics-NC: *miR-128-3p* mimics negative control transfected into SKOV3 cells; *miR-128-3p* mimics: *miR-128-3p* mimics transfected into SKOV3 cells; Compared with mimics-NC group; *** *P* < 0.001.

4 PAE 通过调控 *miR-128-3p* 抑制卵巢癌细胞的增殖

SKOV3 组、PAE 组、PAE + inhibitor - NC 组和 PAE + *miR-128-3p* inhibitor 组的细胞增殖率分别为 (38.74 ± 4.53) % 、 (20.68 ± 2.41) % 、 (18.95 ± 2.43) % 和 (34.17 ± 5.59) % 。与 SKOV3 组相比,PAE 组的细胞增殖率显著减少 ($P < 0.001$); 与 PAE 组相比,PAE + inhibitor - NC 组的细胞增殖率在统计学上差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 PAE + inhibitor - NC 组相比,PAE + *miR-128-3p* inhibitor 组的细胞增殖率显著增加 ($P < 0.001$)。

5 PAE 通过上调 *miR-128-3p* 抑制 NEK2 的表达

SKOV3 组、PAE 组、PAE + inhibitor - NC 组和 PAE + *miR-128-3p* inhibitor 组的 *miR-128-3p* 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12、2.34 ± 0.27、2.30 ± 0.29 和 1.19 ± 0.21, *NEK2* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13、0.58 ± 0.09、0.61 ± 0.12 和 0.93 ± 0.18, *NEK2* 的阳性表达分别为 1.00 ± 0.11、0.29 ± 0.05、0.31 ± 0.06 和 0.94 ± 0.17, PAE 组的上述指标与 SKOV3 组比较,PAE + *miR-128-3p* inhibitor

组的上述指标与 PAE + inhibitor - NC 组比较,在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$), 见表 2。

6 PAE 通过上调 *miR-128-3p* 介导 NEK2 影响卵巢癌细胞上皮间质转化

SKOV3 组、PAE 组、PAE + inhibitor - NC 组、PAE + *miR-128-3p* inhibitor 组、PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - NC 组和 PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - *NEK2* 组的 *E-cadherin* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12、2.25 ± 0.29、2.27 ± 0.34、1.30 ± 0.21、1.32 ± 0.20 和 2.03 ± 0.35, *N-cadherin* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14、0.60 ± 0.09、0.63 ± 0.12、0.92 ± 0.17、0.94 ± 0.18 和 0.67 ± 0.13, *Vimentin* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13、0.62 ± 0.09、0.66 ± 0.11、0.90 ± 0.17、0.92 ± 0.18 和 0.71 ± 0.13; PAE 组的上述指标与 SKOV3 组比较,PAE + *miR-128-3p* inhibitor 组的上述指标与 PAE + inhibitor - NC 组比较,PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - *NEK2* 组的上述指标与 PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - NC 组比较,在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 见表 3。

表 2 各组细胞中 *miR-128-3p* 和 *NEK2* mRNA 及 *NEK2* 阳性的相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Relative expression levels of *miR-128-3p*, *NEK2* mRNA and *NEK2* protein in different cell groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	<i>miR-128-3p</i>	<i>NEK2</i> mRNA	<i>NEK2</i> protein
SKOV3	8	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.11
PAE	8	2.34 ± 0.27***	0.58 ± 0.09***	0.29 ± 0.05***
PAE + inhibitor - NC	8	2.30 ± 0.29	0.61 ± 0.12	0.31 ± 0.06
PAE + <i>miR-128-3p</i> inhibitor	8	1.19 ± 0.21###	0.93 ± 0.18###	0.94 ± 0.17###

SKOV3 group: SKOV3 cells under normal culture conditions; PAE group: SKOV3 cells treated with 4 mmol · L⁻¹ PAE; PAE + inhibitor - NC group: Based on the PAE group, *miR-128-3p* inhibitor negative control was transfected; PAE + *miR-128-3p* inhibitor group: Based on the PAE group, *miR-128-3p* inhibitor was transfected; Compared with SKOV3 group: *** $P < 0.001$; Compared with PAE + inhibitor - NC group: ### $P < 0.001$.

表 3 各组细胞中上皮间质转化 (EMT) 相关因子 mRNA 的相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Relative expression levels of epithelial - mesenchymal transition (EMT) - related factors mRNA in different cell groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	<i>E-cadherin</i>	<i>N-cadherin</i>	<i>Vimentin</i>
SKOV3	8	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.13
PAE	8	2.25 ± 0.29***	0.60 ± 0.09***	0.62 ± 0.09***
PAE + inhibitor - NC	8	2.27 ± 0.34	0.63 ± 0.12	0.66 ± 0.11
PAE + <i>miR-128-3p</i> inhibitor	8	1.30 ± 0.21###	0.92 ± 0.17##	0.90 ± 0.17##
PAE + <i>miR-128-3p</i> inhibitor + si - NC	8	1.32 ± 0.20	0.94 ± 0.18	0.92 ± 0.18
PAE + <i>miR-128-3p</i> inhibitor + si - <i>NEK2</i>	8	2.03 ± 0.35 ^{△△△}	0.67 ± 0.13 ^{△△}	0.71 ± 0.13 [△]

PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - NC group: Based on the PAE group, co - transfected with *miR-128-3p* inhibitor and si - *NEK2* negative control; PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - *NEK2* group: Based on the PAE group, co - transfected with *miR-128-3p* inhibitor and si - *NEK2*; Compared with SKOV3 group, *** $P < 0.001$; Compared with PAE + inhibitor - NC group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - NC group, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$, ^{△△△} $P < 0.001$.

7 PAE 通过上调 *miR-128-3p* 介导 NEK2 促进卵巢癌细胞内质网应激诱导的细胞凋亡

SKOV3 组、PAE 组、PAE + inhibitor - NC 组、PAE + *miR-128-3p* inhibitor 组、PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - NC 组和 PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - NEK2 组的 ATF4 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 3.22 ± 0.57 、 3.31 ± 0.60 、 1.51 ± 0.24 、 1.49 ± 0.21 和 2.97 ± 0.44 ，CHOP 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 3.85 ± 0.47 、 3.62 ± 0.41 、 1.31 ± 0.17 、 1.28 ± 0.17 和 3.26 ± 0.57 ，Cleaved - caspase - 3 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13 、 4.52 ± 0.67 、 4.61 ± 0.71 、 1.67 ± 0.26 、 1.69 ± 0.31 和 4.11 ± 0.76 。与 SKOV3 组相比，PAE 组中 ATF4 蛋白、CHOP 蛋白和 Cleaved - caspase - 3 蛋白的相对表达水平均显著上升(均 $P < 0.001$)；与 PAE 组相比，PAE + inhibitor - NC 组中 ATF4 蛋白、CHOP 蛋白和 Cleaved - caspase - 3 蛋白的相对表达水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)；与 PAE + inhibitor - NC 组相比，PAE + *miR-128-3p* inhibitor 组中 ATF4 蛋白、CHOP 蛋白和 Cleaved - caspase - 3 蛋白的相对表达水平均显著下降(均 $P < 0.001$)；与 PAE + *miR-128-3p* inhibitor 组相比，PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - NC 组中 ATF4 蛋白、CHOP 蛋白和 Cleaved - caspase - 3 蛋白的相对表达水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)；与 PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - NC 组相比，PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - NEK2 组中 ATF4 蛋白、CHOP 蛋白和 Cleaved - caspase - 3 蛋白的相对表达水平均显著上升(均 $P < 0.001$)，见图 2。

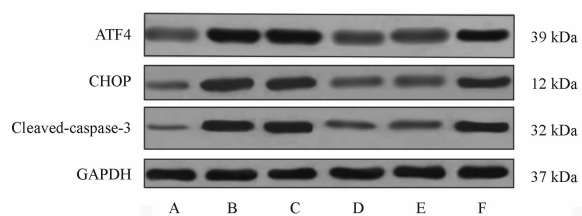


图2 蛋白质印迹法检测激活转录因子4(ATF4)、C/EBP同源蛋白(CHOP)和切割型半胱天冬酶-3(cleaved-caspase-3)蛋白的相对表达水平

Figure 2 Relative expression levels of activating transcription factor 4 (ATF4), C/EBP homologous protein (CHOP) and Cleaved - caspase - 3 protein detected by Western blot

A: SKOV3 group; B: PAE group; C: PAE + inhibitor - NC group; D: PAE + *miR-128-3p* inhibitor group; E: PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - NC group; F: PAE + *miR-128-3p* inhibitor + si - NEK2 group.

讨 论

卵巢癌为女性生殖系统常见的恶性肿瘤，在全国范围内的发病率呈现显著上升趋势，据统计，每年的新发病例数超过 5.7 万，病死人数接近 3 万^[8]。卵巢癌的发生发展与多种因素有关，包括卵巢癌家族史、乳腺癌易感基因突变、肥胖、绝经后激素替代治疗、不孕不育等。目前，临床上治疗卵巢癌主要采用手术联合化疗，但由于卵巢癌早期诊断困难，且具有较高的侵袭和转移性等特点，患者治疗效果有限。因此，探索卵巢癌发生发展的分子机制，寻找有效的治疗靶点及治疗策略，已成为当前卵巢癌研究领域的重要课题。

PAE 是一种存在于毛茛科植物牡丹根皮中的小分子酚类化合物，具有多种作用，包括抗炎、抗肿瘤、心血管保护、肝保护、神经保护、代谢调节等^[9]。既往研究表明，PAE 呈剂量 - 时间依赖性抑制卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖，同时对正常卵巢上皮细胞表现出较低的细胞毒性^[10]，提示其在卵巢癌中具有良好的治疗潜力。微小 RNA 作为一类重要的非编码 RNA，通过调控靶基因的表达，在肿瘤的增殖、凋亡、侵袭和转移等关键生物学进程中发挥重要作用，已成为肿瘤研究的热点领域。*miR-128-3p* 具有调控脂肪生成和脂肪分解、保护心肌细胞、保护神经、抑制炎症反应和抗肿瘤等多种作用^[11-12]。莫蕊等^[13]研究发现，通过促进 *miR-128-3p* 表达可以下调丝裂原活化蛋白激酶相互作用丝氨酸/苏氨酸激酶 2 表达，进而抑制卵巢癌细胞的紫杉醇耐药性，提示 *miR-128-3p* 在卵巢癌治疗中具有重要价值。NEK2 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶，在耐药、低生存率和肿瘤发生中起重要作用，研究表明，NEK2 与卵巢癌中升高的挽救性嘧啶和吡哆醛通路有关，可成为卵巢癌的治疗靶点^[14]。本研究显示，卵巢癌细胞中 *miR-128-3p* 低表达，NEK2 mRNA 高表达，且 NEK2 是 *miR-128-3p* 的靶点。PAE 可降低细胞增殖率及 NEK2 表达，升高 *miR-128-3p* 表达，抑制 *miR-128-3p* 表达后结果相反，推测 PAE 可能上调 *miR-128-3p* 表达并抑制 NEK2 表达，进而发挥对卵巢癌的治疗作用。

EMT 指上皮细胞表型的消失和出现间质细胞的表型，表现为 *E-cadherin* 和细胞角蛋白等上皮细胞表型表达的降低和 *N-cadherin* 和 *Vimentin* 等间质细胞表型表达的升高，是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞

获得迁移和侵袭能力的重要途径。本研究显示,PAE 组 *N-cadherin* 和 *Vimentin* mRNA 相对表达水平均显著降低,*E-cadherin* mRNA 相对表达水平显著升高,与谢婷婷等^[15]研究发现 *miR-455-3p* 通过靶向调控转脂蛋白 4 从而抑制卵巢癌细胞增殖及 EMT 结果相似。且 *miR-128-3p* 抑制剂显著促进卵巢癌细胞的 EMT 过程,敲低 *NEK2* 则抑制 EMT 进程,说明 2 者共同参与卵巢癌的发生发展。通过内质网应激的途径可促进卵巢癌细胞凋亡。目前,已知内质网应激与 CHOP、ATF4 的表达有关,CHOP 为一种内质网应激中的关键蛋白,ATF4 能够促进其表达。Cleaved-caspase-3 为评估细胞凋亡程度的重要指标。本研究显示,PAE 促进内质网应激通路相关蛋白 ATF4、CHOP 和 Cleaved-caspase-3 的蛋白表达,促进 SKOV3 细胞凋亡。

本研究提示:PAE 对卵巢癌具有抑制 EMT,促进内质网应激诱导的细胞凋亡的作用,该作用可能是通过上调 *miR-128-3p* 抑制 *NEK2* 表达实现的,为卵巢癌的治疗提供了新的思路。然而,实验仅基于 SKOV3 细胞系进行,尚未在其他卵巢癌细胞或动物实验中验证 PAE 的作用及其机制。后续研究需拓展至更多细胞系及体内模型,并结合临床样本分析 *miR-128-3p* 与 *NEK2* 的表达与患者预后的相关性,以全面评估 PAE 的治疗价值及分子通路。

参考文献:

- [1] SIEGEL REBECCA L, MILLER KIMBERLY D, JEMAL AHMEDIN. Cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7—30.
- [2] 张传凤, 颜贵明, 马克龙. 丹皮酚抗癌作用及机制近五年研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(10): 158—161.
- [3] LIJUAN Z, AIHUA W, MEI G, et al. LncRNA MIR4435-2HG triggers ovarian cancer progression by regulating *miR-128-3p*/CKD14 axis[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(9): 145.
- [4] 王静, 苏晓玲, 贺海威, 等. 多数据库联合分析卵巢癌预后相关基因[J]. 海军军医大学学报, 2022, 43(2): 167—173.
- [5] 牛琴, 钮红丽, 翟俊英, 等. 丹皮酚通过内质网应激和线粒体损伤途径促进卵巢癌细胞凋亡[J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(10): 1991—1998.
- [6] 吴洁, 顾平, 孙茜, 等. *Linc00996* 通过调控 *miR-9-5p* 抑制小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(20): 2501—2505.
- [7] 李湛, 王钰. 和厚朴酚在乳腺癌细胞上皮间质转化中的作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(17): 2488—2492.
- [8] CHANGFA X, XUESI D, HE L, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: Profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5): 584—590.
- [9] 杨山景, 李凌军. 丹皮酚药理作用与应用研究进展错误! 未找到引用源[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(5): 237—241.
- [10] LIKUN G, ZHI W, DANHUA L, et al. Paeonol induces cytoprotective autophagy via blocking the Akt/mTOR pathway in ovarian cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 609.
- [11] CHEN C, DENG Y, HU X, et al. *miR-128-3p* regulates 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis by targeting Pparg and Sertad2 [J]. *J Physiol Biochem*, 2018, 74(3): 381—393.
- [12] ZHAO J, LI D, FANG L. *MiR-128-3p* suppresses breast cancer cellular progression via targeting LIMK1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 22(2): 234—245.
- [13] 莫蕊, 陈燕娥, 吴颖, 等. *CircASH2L* 调节 *miR-128-3p*/MKNK2 轴对卵巢癌细胞紫杉醇耐药性的影响[J]. 现代妇产科进展, 2023, 32(4): 258—263.
- [14] KHEDKAR H N, WANG Y C, YADAV V K, et al. In-silico evaluation of genetic alterations in ovarian carcinoma and therapeutic efficacy of NSC777201, as a novel multi-target agent for TTK, NEK2, and CDK1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5895.
- [15] 谢婷婷, 苏瑛, 吴利英, 等. *miR-455-3p* 通过靶向调控转脂蛋白 4 抑制卵巢癌细胞 SKOV-3 的增殖、迁移及上皮间质转化[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(3): 306—311.

(收稿日期 2025-05-11)