

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research双氢青蒿素通过 *miRNA* - 346/*KLF14* 轴介导
GPX4 信号通路促进宫颈癌铁死亡发挥抗肿瘤
作用的研究Research of dihydroartemisinin in promoting ferroptosis by the *miRNA* - 346/*KLF14*
axis - mediated GPX4 signaling pathway to exert anti - tumor effects in cervical
cancer张颂婕, 张莉莉, 李 婷,
林倩如, 崔彬彬(厦门大学 附属中山医院 妇科, 福建 厦门
361003)ZHANG Song - jie, ZHANG Li - li,
LI Ting, LIN Qian - ru,
CUI Bin - bin(Gynecology Department, Zhongshan
Hospital Affiliated to Xiamen University,
Xiamen 361003, Fujian Province,
China)基金项目: 厦门市自然科学基金资助项目
(3502Z202374015)作者简介: 张颂婕(1987 -), 女, 副主任医师,
主要从事妇科肿瘤与内分泌方面的
研究和工作通信作者: 崔彬彬, 副主任医师
MP: 13459218526

E - mail: cuihb0206@163. com

摘要:目的 研究双氢青蒿素(DHA)通过微小RNA(*miRNA*) - 346/Kruppel样因子14(*KLF14*)对宫颈癌铁死亡影响及其作用机制。方法 在细胞实验中, 将细胞分为细胞正常对照组(HcerEpic细胞, 不予处理)、细胞阴性对照组(Hela细胞, 不予处理)、细胞实验组(246.90 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DHA处理Hela细胞24 h)、DHA + mimic NC组(基于细胞实验组转染mimic NC)、DHA + *miRNA* - 346 mimic组(基于细胞实验组转染*miRNA* - 346 mimic)、DHA + sh - NC组(基于细胞实验组转染sh - NC)和DHA + sh - *KLF14*组(基于细胞实验组转染sh - *KLF14*)。在动物实验中, 30只雌性BALB/c裸鼠予皮肤注射Hela细胞构建移植瘤模型, 随机分为动物对照组(灌胃等量生理盐水)和动物低、高剂量实验组(灌胃100、200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DHA), 每组10只。用实时荧光定量聚合酶链反应实验法检测*miRNA* - 346相对表达水平; 用蛋白印迹法检测*KLF14*、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)和溶质载体家族7成员11(SLC7A11)蛋白相对表达水平; 用荧光探针法检测 Fe^{2+} 水平; 用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记法检测细胞凋亡率; 用免疫组织化学法检测*KLF14*和GPX4蛋白水平。结果 在细胞实验中, 细胞阴性对照组和细胞实验组的*miRNA* - 346相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 和 0.42 ± 0.06 , *KLF14* mRNA相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 和 2.22 ± 0.32 , *KLF14*蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 和 1.72 ± 0.23 ; 细胞阴性对照组、细胞实验组、DHA + mimic NC组、DHA + *miRNA* - 346 mimic组、DHA + sh - NC组和DHA + sh - *KLF14*组的 Fe^{2+} 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.15 、 4.86 ± 0.81 、 4.32 ± 0.62 、 3.12 ± 0.57 、 4.23 ± 0.59 和 2.02 ± 0.33 , GPX4蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 0.45 ± 0.06 、 0.48 ± 0.07 、 0.78 ± 0.11 、 0.44 ± 0.06 和 0.59 ± 0.08 , SLC7A11蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、 0.37 ± 0.05 、 0.35 ± 0.04 、 0.86 ± 0.12 、 0.40 ± 0.07 和 0.77 ± 0.10 , 细胞增殖率分别为 $(100.00 \pm 3.65)\%$ 、 $(54.32 \pm 7.65)\%$ 、 $(56.32 \pm 8.02)\%$ 、 $(72.33 \pm 8.65)\%$ 、 $(52.32 \pm 9.23)\%$ 和 $(88.25 \pm 10.35)\%$, 细胞凋亡率分别为 $(14.32 \pm 1.61)\%$ 、 $(61.33 \pm 8.25)\%$ 、 $(57.32 \pm 7.13)\%$ 、 $(32.44 \pm 5.37)\%$ 、 $(59.63 \pm 8.98)\%$ 和 $(23.88 \pm 3.49)\%$ 。细胞实验组与细胞阴性对照组相比, DHA + *miRNA* - 346 mimic组与DHA + mimic NC组相比, DHA + sh - *KLF14*组与DHA + sh - NC组相比, 以上指标在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.001$)。在动物实验中, 动物对照组、动物低剂量实验组和动物高剂量实验组的肿瘤体积分别为 (542.36 ± 92.33) 、 (402.85 ± 92.28) 和 $(295.52 \pm 60.56) \text{mm}^3$, 肿瘤质量分别为 (1.55 ± 0.33) 、 (1.22 ± 0.22) 和 $(0.88 \pm 0.15) \text{g}$, GPX4蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 、 0.55 ± 0.07 和 0.42 ± 0.04 , SLC7A11蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 0.48 ± 0.06 和 0.29 ± 0.03 。动物低、高剂量实验组与动物对照组相比, 以上指标在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。

结论 DHA 可以诱导宫颈癌细胞发生铁积累、抑制 GPX4/SLC7A11 表达,并促进细胞死亡,提示铁死亡可能参与其抗肿瘤作用,该过程可能与 *miRNA* - 346/*KLF14* 轴调控有关。

关键词:双氢青蒿素;宫颈癌;微小 RNA - 346;Kruppel 样因子 14;铁死亡;抗肿瘤

DOI:10. 13699/j. cnki. 1001 - 6821. 2026. 09. 017

中图分类号:R28 文献标志码: A

文章编号:1001 - 6821(2026)09 - 1308 - 08

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of dihydroartemisinin (DHA) on ferroptosis in cervical cancer by the microRNA (*miRNA*) - 346/Kruppel - like factor 14 (*KLF14*) axis. **Methods** In cell experiment, human cervical cancer Hela cells were treated and divided into several groups including cell normal control group (only HcerEpic cell), cell negative control group (only Hela cell), cell experimental group (Hela cell treated with $246.90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DHA for 48 h), DHA + mimic NC group (transferred with mimic NC based on the cell experimental group), DHA + miR - 346 mimic group (transfected with miRNA - 346 mimic based on the cell experimental group), DHA + sh - NC group (transfected with sh - NC based on the cell experimental group) and DHA + sh - *KLF14* group (transfected with sh - *KLF14* based on the cell experimental group). In animal experiment, a xenograft tumor model was established by subcutaneous injection of Hela cells into 30 female BALB/c nude mice, which were then divided into the animal control group (gavaged with saline), animal experimental - L group (gavaged with $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DHA) and animal experimental - H group (gavaged with $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DHA), with 10 mice in each group. The relative expression level of *miRNA* - 346 was detected by quantitative real - time polymerase chain reaction. The relative expression levels of *KLF14* protein, glutathione peroxidase 4 (GPX4) and solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) were measured by Western blot. Intracellular Fe^{2+} levels were detected using FerroOrange fluorescent probe. The apoptosis rate was determined by the terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP nick - end labeling (TUNEL) assay. **Results** In cell experiment, the relative expression levels of *miRNA* - 346 in the cell negative group and cell experimental group were 1.00 ± 0.18 and 0.42 ± 0.06 , respectively; the relative expression levels of *KLF14* mRNA were 1.00 ± 0.17 and 2.22 ± 0.32 , respectively; the relative expression levels of *KLF14* protein were 1.00 ± 0.15 and 1.72 ± 0.23 , respectively; the relative fluorescence intensities of Fe^{2+} of cell negative control group, cell experimental group, DHA + mimic NC group, DHA + miRNA - 346 mimic group, DHA + sh - NC group and DHA + sh - *KLF14* group were 1.00 ± 0.15 , 4.86 ± 0.81 , 4.32 ± 0.62 , 3.12 ± 0.57 , 4.23 ± 0.59 and 2.02 ± 0.33 , respectively; the relative expression levels of GPX4 protein were 1.00 ± 0.17 , 0.45 ± 0.06 , 0.48 ± 0.07 , 0.78 ± 0.11 , 0.44 ± 0.06 and 0.59 ± 0.08 , respectively; the relative expression levels of SLC7A11 protein were 1.00 ± 0.12 , 0.37 ± 0.05 , 0.35 ± 0.04 , 0.86 ± 0.12 , 0.40 ± 0.07 and 0.77 ± 0.10 , respectively; the cell proliferation rates were $(100.00 \pm 3.65)\%$, $(54.32 \pm 7.65)\%$, $(56.32 \pm 8.02)\%$, $(72.33 \pm 8.65)\%$, $(52.32 \pm 9.23)\%$ and $(88.25 \pm 10.35)\%$, respectively; the apoptosis rates were $(14.32 \pm 1.61)\%$, $(61.33 \pm 8.25)\%$, $(57.32 \pm 7.13)\%$, $(32.44 \pm 5.37)\%$, $(59.63 \pm 8.98)\%$ and $(23.88 \pm 3.49)\%$, respectively. Significant differences were observed in the aforementioned parameters when comparing the cell experimental group with the cell negative group, comparing the DHA + miRNA - 346 mimic group with the DHA + mimic NC group, and comparing the DHA + sh - *KLF14* group with the DHA + sh - NC group ($P < 0.01$, $P < 0.001$). In animal group, the tumor volumes in the animal control, experimental - L and experimental - H groups were (542.36 ± 92.33) , (402.85 ± 92.28) and $(295.52 \pm 60.56) \text{ mm}^3$, respectively; the tumor masses were (1.55 ± 0.33) , (1.22 ± 0.22) and $(0.88 \pm 0.15) \text{ g}$, respectively; the relative positive levels of GPX4 were 1.00 ± 0.18 , 0.55 ± 0.07 and 0.42 ± 0.04 , respectively; the relative positive levels of SLC7A11 were 1.00 ± 0.16 , 0.48 ± 0.06 and 0.29 ± 0.03 , respectively. Significant differences were also detected between the animal experimental - L, - H group and the animal control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** DHA promotes ferroptosis in cervical cancer by the *miRNA* - 346/*KLF14* axis - mediated GPX4 signaling pathway.

Key words: dihydroartemisinin; cervical cancer; microRNA - 346; Kruppel - like factor 14; ferroptosis; anti - tumor

宫颈癌是全球范围内女性中第4大常见癌症,也是癌症相关死亡的第4大原因^[1]。双氢青蒿素(dihydroartemisinin,DHA)是一种青蒿素衍生物,最初是治疗疟疾的有效药物且药物不良反应极小,后续研究发现,其能够对宫颈癌肿瘤细胞系(包括耐药细胞系)产生抗增殖作用,并以剂量和时间依赖性方式抑制细胞生长并诱导凋亡,其具有的抗宫颈癌效应与铁离子转运相关^[2]。*miRNA-346*是宫颈癌的致癌基因之一,可以通过影响细胞增殖介导宫颈癌进展^[3]。Kruppel样因子14(Kruppel-like factor 14,*KLF14*)是KLF家族新发现的成员,具有锌指DNA结合结构域,它在多种生物学过程中发挥作用,包括代谢、免疫和细胞凋亡。近年来,*KLF14*在肿瘤中的作用日益受到关注,有证据表明,其可以调控调节铁死亡发挥抗宫颈癌效果^[4]。DHA是否通过*miRNA-346*靶向*KLF14*来介导铁死亡影响宫颈癌仍需进一步研究。本研究拟用裸鼠和人宫颈癌细胞系及建立体内外模型,探讨DHA对宫颈癌铁死亡的影响相关机制。

材料与方法

1 材料

细胞 人宫颈癌细胞(Hela)和人胚肾细胞(HEK 293T),均购自湖北武汉普诺赛生命科技有限公司;人正常宫颈上皮细胞(HcerEpic),购自上海弘顺生物科技有限公司。

动物 雌性BALB/c裸鼠30只,5~6周龄,体重18~22 g,购自江苏华创信诺医药科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(苏)2025-0012;动物使用许可证号:SYXK(苏)2025-0055。本实验经厦门大学附属中山医院医学伦理委员会科研分委会批准,伦理批号:xmzsyky 伦审第(2023-126)号。

药品与试剂 DHA,规格:每瓶20 mg,纯度:HPLC ≥98%,批号:S31426,上海源叶生物科技有限公司生产;总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒、脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling,TUNEL)试剂盒,均购自湖北武汉翌圣生物科技有限公司;*KLF14*、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4)、溶质载体家族7成员11(solute carrier family7 member11,SLC7A11)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)羊抗兔二抗,均购自美国赛默飞世尔科技有

限公司;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8,CCK-8)检测试剂盒和4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)染料,均购自上海碧云天生物技术有限公司;双荧光素酶试剂盒,购自美国MCE生物科技公司;FerroOrange检测试剂盒,购自日本Dojindo公司;稳定转染*KLF14*敲低慢病毒及其阴性对照慢病毒细胞系,均由上海吉凯基因公司构建;Lipofectamine 3000转染试剂,购自上海科夷生物科技有限公司。

仪器 BZ-X1000荧光显微镜,日本基恩士有限公司产品;Multiskan SkyHigh-全波长酶标仪,美国赛默飞世尔科技有限公司产品;Axio Imager 2研究级正置显微镜,德国卡尔·蔡司公司产品;eZwestTM免疫印迹化学显色仪,江苏南京金斯瑞生物科技有限公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞实验

2.1.1 细胞培养^[5]

细胞均用DMEM培养基进行培养,培养基中添加10%胎牛血清及1%青霉素/链霉素双抗溶液,并于37℃、5%CO₂恒温培养箱中稳定培养。每24 h更换1次培养液,待细胞长满瓶底进行传代,取第4代细胞进行后续实验。

2.1.2 细胞分组及处理

将对数期生长细胞根据实验要求分为以下11组:细胞正常对照组、细胞阴性对照组、细胞实验组、mimic NC组、*miRNA-346* mimic组、sh-NC组、sh-KLF14组、DHA+mimic NC组、DHA+*miRNA-346* mimic组、DHA+sh-NC组和DHA+sh-KLF14组。细胞正常对照组与细胞阴性对照组用于检测*miRNA-346*和*KLF14*在正常宫颈上皮细胞与宫颈癌细胞中的基础表达差异;细胞实验组用于观察DHA对Hela细胞的直接作用;mimic NC组与*miRNA-346* mimic组用于验证*miRNA-346*过表达效率及其对*KLF14*的靶向调控关系;sh-NC组与sh-KLF14组用于验证*KLF14*敲低效率;DHA+mimic NC组、DHA+*miRNA-346* mimic组、DHA+sh-NC组及DHA+sh-KLF14组用于机制验证。

具体处理如下:细胞正常对照组为HcerEpic细胞正常培养,不做任何处理;细胞阴性对照组为Hela细胞正常培养不做任何处理;细胞实验组为用246.90 μmol·L⁻¹ DHA培养Hela细胞24 h;sh-NC组为Hela细胞转染阴性对照慢病毒(sh-NC);sh-KLF14组为Hela细胞转染*KLF14*敲低慢病毒

(sh-KLF14); mimic NC 组为 Hela 细胞转染 mimic NC; miRNA-346 mimic 组为 Hela 细胞转染 miRNA-346 mimic; DHA + mimic NC 组为 Hela 细胞转染 mimic NC, 用 $246.90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DHA 培养 24 h; DHA + miRNA-346 mimic 组为转染 miRNA-346 mimic, 用 $246.90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DHA 培养 24 h; DHA + sh-NC 组为 Hela 细胞转染 sh-NC, 用 $246.90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DHA 培养 24 h; DHA + sh-KLF14 组为 Hela 细胞转染 sh-KLF14, 用 $246.90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DHA 培养 24 h。转染时, 严格按照 Lipofectamine 2000 试剂说明书步骤进行操作。

双荧光素酶实验分组: 将 KLF14-野生型(wild type, WT)、KLF14-突变型(mutant type, MUT)分别与 mimic NC 和 miRNA-346 mimic 共转染至 293T 细胞中。

2.1.3 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测细胞中 miRNA-346 和 KLF14 表达^[6]

用总 RNA 提取试剂盒裂解细胞, 提取细胞中的总 RNA, 检测提取 RNA 的浓度和纯度。用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA, 将逆转录得到的 cDNA 产物作为模板, 加入特定的引物和荧光染料(如 SYBR Green)进行 PCR 扩增。miR-346 上游引物序列: 5'-ACACTCCAGCTGGGTGTCTGCCCCGATGCCT-3'; 下游引物序列: 5'-TGGTGTCGTGGAGTCG-3'。U6 上游引物序列: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT-3'; 下游引物序列: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTCAT-3'。KLF14 上游引物序列: 5'-TTACAAGTCGTCGCACCTCAA-3'; 下游引物序列: 5'-TCTGGATGATAGTTGGGTGG-3'。GAPDH 上游引物序列: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'; 下游引物序列: 5'-GGCTGTGTCTACTTCTCATGG-3'。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miRNA-346 和 KLF14 mRNA 相对表达水平。

2.1.4 蛋白印迹法检测细胞中 KLF14、GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达水平^[7]

收集经处理的细胞, 用 RIPA 裂解液在冰上裂解 30 min, 提取总蛋白后测定蛋白浓度。随后将等量蛋白样品与上样缓冲液混合并煮沸变性, 通过凝胶电泳分离蛋白, 再转印至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, 分别孵育针对 KLF14、GPX4、SLC7A11 及内参蛋白的一抗(4℃过夜)。次日孵育辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(室温 1 h),

再次洗涤后, 用免疫印迹化学显色仪显影, 最后通过化学发光成像系统采集图像并分析目标条带与内参条带的灰度值, 以计算各蛋白的相对表达水平。

2.1.5 双荧光素酶报告基因方法验证 miRNA-346 与 KLF14 靶向关系^[8]

构建 KLF14 WT 和 MUT 质粒, 将 KLF14-WT 和 KLF14-MUT 用 Lipofectamine 3000 转染试剂与 mimic NC 或 miRNA-346 mimic 共转染至 293T 细胞, 转染 48 h, 用双荧光素酶报告基因检测系统进行荧光素酶报告基因检测。

2.1.6 CCK-8 试剂盒法对细胞活力进行定量评估^[9]

将对数生长期的细胞接种于 96 孔板中, 加入不同浓度(0、40、80、160、320、480 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) DHA 处理 24 h。到达处理终点后, 每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL , 继续孵育 1~4 h。孵育结束后, 立即用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的光密度值。计算给药组与对照组吸光度的比值来定量分析细胞相对活力, 同时计算 DHA 半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

2.1.7 FerroOrange 荧光探针法检测细胞 Fe²⁺ 水平^[10]

将细胞接种于 35 mm 共聚焦培养皿中, 在含多西环素(doxycycline, DOX)的培养基内培养 48 h 后, 加入 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ FerroOrange 荧光染料, 并于 37℃ 条件下孵育 30 min。最终用共聚焦激光扫描显微镜采集荧光图像。

2.1.8 Tunel 实验法检测细胞凋亡^[11]

细胞爬片水化后用蛋白酶 K 消化以暴露 DNA 断端; 然后滴加 Tunel 反应混合液(含荧光标记的脱氧尿苷三磷酸和末端脱氧核苷酸转移酶 TdT), 于 37℃ 避光孵育 60 min, 使标记物连接到 DNA 断裂的 3'-OH 末端; 之后用磷酸缓冲液洗净未结合的标记物并用 DAPI 复染细胞核; 最后在荧光显微镜下观察, 凋亡细胞核呈现绿色荧光(异硫氰酸荧光素通道), 而所有细胞核显示蓝色荧光(DAPI 通道), 通过计数绿色荧光细胞的比例即可定量分析凋亡水平。

2.2 动物实验

2.2.1 宫颈癌皮下移植瘤构建与分组^[12]

于裸鼠右侧腋下皮下接种的 Hela 细胞悬液 0.1 mL(细胞密度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)。接种 1 周后, 测量瘤体体积。当肿瘤体积生长至 80~90 mm³ 时,

表明模型构建成功,可以用于后续药效学实验。将小鼠分为动物对照组、低剂量实验组和高剂量实验组,每组10只。对照组小鼠每日接受等量生理盐水灌胃;低、高剂量实验组动物则分别每日施予100和200 mg·kg⁻¹ DHA灌胃处理,每组处理均持续进行10 d。

2.2.2 肿瘤体积测定

给药处理10 d后处死小鼠,用电子天平称取肿瘤质量,肿瘤体积=长径(L)×最短径(W)²×0.5。

2.2.3 免疫组织化学法检测各组织中 GPX4 和 SLC7A11 阳性水平^[13]

鼠肿瘤组织经4%多聚甲醛固定、石蜡包埋后切片(厚度4 μm),用SLC7A11(1:2 000稀释)和GPX4(1:5 000稀释)抗体,4℃孵育过夜。次日,经磷酸缓冲液冲洗后,与HRP标记的二抗室温孵育1 h,用DAB显色液显色,用苏木素复染细胞核,在显微镜下观察并采集图像,通过分析阳性细胞比例及染色强度评估目标蛋白相对表达水平。

3 统计学处理

用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。计数资料用率(%)表示,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用非配对 t 检验进行数据处理。

结 果

1 HeLa 细胞中 miRNA-346 和 KLF14 水平变化

细胞正常对照组和阴性对照组的 miRNA-346 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 和 3.23 ± 0.54, KLF14 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 和 0.58 ± 0.06, KLF14 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.22 和 0.63 ± 0.10, 与细胞正常对照组相比,细胞阴性对照组的上述指标均显著降低(均 $P < 0.001$)。

2 细胞过表达效率验证

用 qRT-PCR 检测过表达效率显示, mimic NC 组

和 miRNA-346 mimic 组的 miRNA-346 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13 和 4.02 ± 0.66, 与 mimic NC 组相比, miRNA-346 mimic 组的 miRNA-346 相对表达水平显著升高($P < 0.001$); sh-NC 组和 sh-KLF14 组的 KLF14 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 和 0.35 ± 0.05, 与 sh-NC 组相比, sh-KLF14 组的 KLF14 mRNA 相对表达水平显著降低($P < 0.001$)。

3 miRNA-346 和 KLF14 靶向调控关系

用 TargetScan 数据库 (<http://www.targetscan.org>) 预测 miRNA-346 与 KLF14 存在结合位点, 见图1。双荧光素酶实验显示, miRNA-346 mimic 能够降低转染 KLF14-WT 的 293T 细胞荧光素酶活性, 但对转染 KLF14-MUT 的 293T 荧光素酶活性无显著影响, 见表1。qRT-PCR 和蛋白质印迹法显示, 与 mimic NC 组相比, miRNA-346 mimic 组 KLF14 mRNA 和蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.001$), 见表1。

4 DHA 对 HeLa 细胞增殖率的影响

用 CCK-8 法检测不同浓度 DHA 对 HeLa 细胞增殖率的影响, 0、40、80、160、320 和 480 μmol·L⁻¹ DHA 处理组的增值率分别为 (100.00 ± 4.12)%、(85.89 ± 13.65)%、(79.32 ± 10.32)%、(62.08 ± 10.65)%、(46.32 ± 6.23)% 和 (28.32 ± 4.33)%, 与 0 μmol·L⁻¹ DHA 处理组相比, 40~480 μmol·L⁻¹ DHA 处理下 HeLa 细胞增殖率均显著降低(均 $P < 0.05$), 且与剂量呈反比, 计算 IC₅₀ 值为 246.90 μmol·L⁻¹, 后续实验选择此给药剂量进行。

5 DHA 对 HeLa 细胞 miRNA-346 和 KLF14 水平的影响

qRT-PCR 检测显示, 细胞阴性对照组、细胞实验

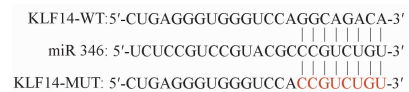


图1 miRNA-346 靶向调控 Kruppel 样因子 14(KLF14)

Figure 1 miRNA-346 targeted regulation of Kruppel-like factor 14 (KLF14)

表1 miRNA-346 对 KLF14 的靶向调控关系验证($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Validation of the targeted regulatory relationship between miRNA-346 and KLF14 ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	KLF14-WT	KLF14-MUT	KLF14 mRNA	KLF14 protein
mimic NC	8	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.15
miRNA-346 mimic	8	0.58 ± 0.08***	1.06 ± 0.13	0.46 ± 0.07***	0.38 ± 0.05***

WT: Wild type; MUT: Mutant type; mimic NC: 293T/HeLa cells transfected with negative control mimic; miRNA-346 mimic: 293T/HeLa cells transfected with miRNA-346 mimic; Compared with the mimic NC group, *** $P < 0.001$.

组的 *miRNA* - 346 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 和 0.42 ± 0.06 , 与细胞阴性对照组相比, 细胞实验组中 *miRNA* - 346 相对表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。qRT - PCR 和蛋白质印迹法检测显示, 细胞阴性对照组和细胞实验组的 *KLF14* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 和 2.22 ± 0.32 , *KLF14* 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 和 1.72 ± 0.23 , 与细胞阴性对照组相比, 细胞实验组中 *KLF14* mRNA 和蛋白相对表达水平均显著升高 (均 $P < 0.001$)。

6 DHA 通过 *miRNA* - 346/*KLF14* 轴参与宫颈癌细胞铁死亡相关调控

用 FerroOrange 荧光探针法检测各组细胞 Fe^{2+} 水平显示, 与细胞阴性对照组相比, 细胞实验组中 Fe^{2+} 相对荧光强度显著增强 ($P < 0.001$); 与细胞实验组相比, DHA + mimic NC 组和 DHA + sh - NC 组中 Fe^{2+} 相对荧光强度在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 与 DHA + mimic NC 组相比, DHA + *miRNA* - 346 mimic 组中 Fe^{2+} 相对荧光强度显著降低 ($P < 0.01$); 与 DHA + sh - NC 组相比, DHA + sh - *KLF14* 组中 Fe^{2+} 相对荧光强度显著降低 ($P < 0.001$)。蛋白质印迹法检测显示, 与细胞阴性对照组相比, 细胞实验组中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白相对表达水平均显著降低 (均 $P < 0.001$); 与细胞实验组相比, DHA + mimic NC 组和 DHA + sh - NC 组中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白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 DHA + mimic NC 组相比, DHA + *miRNA* - 346 mimic 组中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白相对表达水平均显著升高 (均 $P < 0.001$); 与 DHA + sh - NC 组相比, DHA +

sh - *KLF14* 组中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白相对表达水平均显著升高 (均 $P < 0.001$), 见图 2 和表 2。

7 DHA 通过 *miRNA* - 346/*KLF14* 轴介导宫颈癌细胞增殖和凋亡

CCK - 8 法检测显示, 与细胞阴性对照组相比, 细胞实验组的增殖率显著降低 ($P < 0.001$); 与细胞实验组相比, DHA + mimic NC 组和 DHA + sh - NC 组的增殖率在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 与 DHA + mimic NC 组相比, DHA + *miRNA* - 346 mimic 组的增殖率显著升高 ($P < 0.01$); 与 DHA + sh - NC 组相比, DHA + sh - *KLF14* 组的增殖率显著升高 ($P < 0.001$)。Tunel 法检测显示, 与细胞阴性对照组相比, 细胞实验组中 Tunel 阳性率显著升高 ($P < 0.001$); 与细胞实验组相比, DHA + mimic NC 组和 DHA + sh - NC 组中 Tunel 阳性率在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 与 DHA + mimic NC

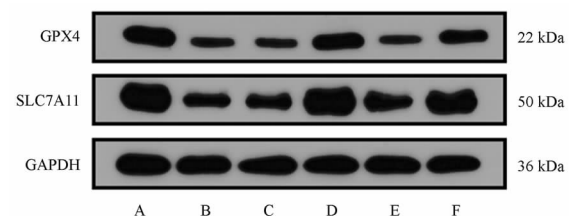


图 2 蛋白质印迹法检测谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 和溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 蛋白相对表达水平

Figure 2 The relative expression levels of glutathione peroxidase 4 (GPX4) and solute carrier family7 member11 (SLC7A11) protein detected by Western blot

A: Cell neagive control group; B: Cell experomental group; C: DHA + mimic NC group; D: DHA + *miRNA* - 346 mimic group; E: DHA + sh - NC group; F: DHA + sh - *KLF14* group.

表 2 各组 Hela 细胞铁死亡相关指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparision of ferroptosis marker levels among the groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Fe^{2+} relative fluorescence intensity	GPX4	SLC7A11
Cell neagive control	8	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.12
Cell expermental	8	$4.86 \pm 0.81^{***}$	$0.45 \pm 0.06^{***}$	$0.37 \pm 0.05^{***}$
DHA + mimic NC	8	4.32 ± 0.62	0.48 ± 0.07	0.35 ± 0.04
DHA + <i>miRNA</i> - 346 mimic	8	$3.12 \pm 0.57^{##}$	$0.78 \pm 0.11^{###}$	$0.86 \pm 0.12^{###}$
DHA + sh - NC	8	4.23 ± 0.59	0.44 ± 0.06	0.40 ± 0.07
DHA + sh - <i>KLF14</i>	8	$2.02 \pm 0.33^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.59 \pm 0.08^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.77 \pm 0.10^{\Delta\Delta\Delta}$

Cell neagive control group: Hela cells were cultured normally; Cell expermental group: Hela cells were treated with $246.90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DHA for 24 h; DHA + mimic NC group: Hela cells were transfected with mimic NC followed by DHA treatment; DHA + *miRNA* - 346 mimic group: Hela cells were transfected with *miRNA* - 346 mimic followed by DHA treatment; DHA + sh - NC group: Hela cells were transfected with sh - NC followed by DHA treatment; DHA + sh - *KLF14* group: Hela cells were transfected with sh - *KLF14* followed by DHA treatment; Compared with cell neagive control, $^{***} P < 0.001$; Compared with the DHA + mimic NC group, $^{##} P < 0.01$, $^{###} P < 0.001$; Compared with the DHA + sh - NC group, $^{\Delta\Delta\Delta} P < 0.001$.

组相比,DHA + miRNA - 346 mimic 组中 Tunel 阳性率显著降低 ($P < 0.001$); 与 DHA + sh - NC 组相比,DHA + sh - KLF14 组中 Tunel 阳性率显著降低 ($P < 0.001$), 见表 3。

8 DHA 对宫颈癌肿瘤生长及 GPX4 信号通路的影响

肿瘤体积及质量检测显示,与动物对照组相比,动物低、高剂量实验组中肿瘤体积和质量均显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$)。免疫组化法检测显示,与动物对照组相比,动物低、高剂量实验组中 GPX4 和 SLC7A11 相对阳性水平均显著降低 (均 $P < 0.001$), 见表 4。

表 4 各组宫颈癌移植瘤生长及铁死亡相关蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of the growth of cervical cancer xenografts and the expression of ferroptosis - related proteins ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Volume (mm ³)	Weight (g)	GPX4	SLC7A11
Animal control	10	542.36 ± 92.33	1.55 ± 0.33	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.16
Animal experimental - L	10	402.85 ± 92.28 **	1.22 ± 0.22 *	0.55 ± 0.07 ***	0.48 ± 0.06 ***
Animal experimental - H	10	295.52 ± 60.56 ***	0.88 ± 0.15 ***	0.42 ± 0.04 ***	0.29 ± 0.03 ***

Animal control group: Mice were gavaged with an equal volume of saline daily; Animal experimental - L group: Mice were gavaged with 100 mg · kg⁻¹ DHA daily; Animal experimental - H: Mice were gavaged with 200 mg · kg⁻¹ DHA daily; Compared with the animal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

讨 论

miRNA 是一类长度约 22 个核苷酸的非编码 RNA,通过结合靶 mRNA 的 3' 非翻译区调控基因表达^[14]。在宫颈癌中,多种 miRNA 的表达异常已被证实与肿瘤发生发展密切相关^[15-16]。在本研究中,miRNA - 346 在宫颈癌中呈现显著升高,这与多项关于 miRNA 在肿瘤中表达失调的研究一致。KLF14 家族成员在癌症中常作为 miRNA 的靶基因,其在癌细胞中的表达水平呈现明显差异,这种差异性表达可能通过多种途径影响肿瘤的生物行为^[17]。本研究显示,在宫颈癌细胞中 KLF14 水平明显降低,且双荧光素酶实验证实,KLF14 水平受 miRNA - 346 调控,是 miRNA - 346 的直接靶基因,提示 miRNA - 346/KLF14 轴可能参与宫颈癌的发生发展。在此基础上,本研究进一步观察 DHA 对 miRNA - 346/KLF14 轴及宫颈癌细胞生物学行为的影响,结果显示,DHA 能够显著抑制宫颈癌 Hela 细胞的增殖,降低细胞活力,并促进细胞死亡,同时伴随 miRNA - 346 表达下调及 KLF14 表达上调,这与史乃元等^[18]的研究相互印证。陈露等^[19]在卵巢癌 SKOV3 细胞中的研究也获得了类似发现,证

表 3 各组 Hela 细胞增殖与凋亡的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of proliferation and apoptosis of Hela cells among groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	Proliferation rate (%)	Apoptosis rate (%)
Cell negative control	100.00 ± 3.65	14.32 ± 1.61
Cell experimental	54.32 ± 7.65 ***	61.33 ± 8.25 ***
DHA + mimic NC	56.32 ± 8.02	57.32 ± 7.13
DHA + miRNA - 346 mimic	72.33 ± 8.65 ^{###}	32.44 ± 5.37 ^{###}
DHA + sh - NC	52.32 ± 9.23	59.63 ± 8.98
DHA + sh - KLF14	88.25 ± 10.35 ^{△△△}	23.88 ± 3.49 ^{△△△}

Dose and *n* refer to table 2. Compared with the cell negative control group, *** $P < 0.001$; Compared with the DHA + mimic NC group, ^{###} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$; Compared with the DHA + sh - NC group, ^{△△△} $P < 0.001$.

实 DHA 可以显著降低癌细胞活力并抑制其迁移能力,这些独立研究共同支持了 DHA 具有广谱抗肿瘤活性的观点。结合本研究推测,DHA 的抗宫颈癌作用可能部分通过调控 miRNA - 346/KLF14 轴实现。

铁死亡是一种铁依赖性、脂质过氧化驱动的程序性细胞死亡形式,其特征包括铁离子积累、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平升高和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 耗竭。铁死亡作为一种新型程序性细胞死亡方式,其与宫颈癌的关系日益受到重视。研究发现,宫颈癌细胞对铁死亡诱导表现出特殊的敏感性,提示 KLF14 通过直接结合 GPX4 启动子抑制其转录进而诱导宫颈癌细胞铁死亡,过表达 KLF14 可以发挥抗肿瘤铁死亡疗效的重要机制^[20]。本研究显示,DHA 处理后,Hela 细胞内 Fe²⁺ 水平显著升高,同时 GPX4 和 SLC7A11 相对表达水平均显著降低,这些变化提示 DHA 处理后细胞出现了与铁死亡相关的分子特征。除此之外,DHA 可以明显调控 Hela 细胞中 miRNA - 346 和 KLF14 相对表达水平,KLF14 敲低或 miRNA - 346 过表达可以部分逆转 DHA 诱导的 Fe²⁺ 蓄积及 SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平,提示 miRNA - 346/KLF14 调控轴参与了 DHA 抗宫颈癌的过程,其在妇科肿瘤中可能具有保守性功能。同时进

一步提示,*KLF14* 作为上游因子,可能对铁死亡相关信号通路成员表达产生影响,从而发挥抗宫颈癌作用。*KLF14* 作为转录因子,其调控网络可能远比目前已知的复杂,未来需要更多研究来揭示其在铁死亡中的精确作用机制。需要说明的是,由于未使用铁死亡抑制剂或检测脂质过氧化指标,本研究尚不能完全证实 DHA 主要通过铁死亡起作用,仅提示其可能参与抗肿瘤作用,具体机制仍需进一步验证。

Tunel 法检测显示,DHA 处理后,Hela 细胞阳性率达(61.33 ± 8.25)%,提示其显著促进细胞死亡。需指出,Tunel 阳性并不完全等同于凋亡,也可能在其他程序性死亡过程中出现。本研究还观察到, Fe^{2+} 蓄积及 GPX4 和 SLC7A11 表达降低,提示 DHA 可能同时诱发凋亡与铁死亡,且 2 者可能存在串扰。后续需通过检测 caspase 活化、使用特异性抑制剂等实验,进一步明确 2 种死亡方式在 DHA 抗肿瘤中的具体贡献。本研究通过构建宫颈癌 Hela 细胞移植瘤模型,系统评估了 DHA 在体内的抗肿瘤效果。实验显示,与对照组相比,DHA 能够显著抑制肿瘤生长,与李颖等^[21] 在 DHA 对 U14 移植瘤研究中的结果相互印证。免疫组化分析显示,DHA 处理后肿瘤组织中 GPX4 和 SLC7A11 表达均显著降低,这与体外实验中观察到的铁死亡诱导效应一致,提示 DHA 在体内亦可能影响铁死亡相关信号分子的表达,进而参与抑制宫颈癌肿瘤生长。

本研究提示,DHA 可以下调 *miRNA-346* 表达并上调 *KLF14* 表达,伴随 GPX4 和 SLC7A11 下调及 Fe^{2+} 蓄积,并促进宫颈癌细胞死亡,提示铁死亡可能参与其抗肿瘤作用,该过程可能与 *miRNA-346/KLF14* 轴调控有关。

参考文献:

- [1] RAY A. Human papillomavirus and other relevant issues in cervical cancer pathogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(12): 5549.
- [2] TANG T, XIA Q J, XI M R, et al. Dihydroartemisinin and its anticancer activity against endometrial carcinoma and cervical cancer: Involvement of apoptosis, autophagy and transferrin receptor[J]. *Singapore Med J*, 2021, 62(2): 96—103.
- [3] 刘绪园. *miRNA-346* 通过靶定 hTERT 的表达影响宫颈癌细胞增殖[D]. 天津:天津医科大学, 2011.
- [4] LYU X, DING X, YE H, et al. *KLF14* targets *ITGB1* to inhibit the progression of cervical cancer via the PI3K/Akt signalling pathway[J]. *Discov Oncol*, 2022, 13(1): 15.
- [5] PANDEY K, GHOSH S K, SANYAL T, et al. Mycochemistry, antioxidant content, and antioxidant potentiality of the ethanolic extract of *pleurotus florida* and its anti-cancerous effect on HeLa cancer cell line, and antitumor effect on HeLa - implanted mice[J]. *Int J Health Sci*, 2023, 17(1): 18—35.
- [6] YU Q, YANG X, DUAN W D, et al. *miRNA-346* promotes proliferation, migration and invasion in liver cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 3255—3260.
- [7] XIONG J, CHEN P X, HE L, et al. Functional mechanism of hypoxia-like conditions mediating resistance to ferroptosis in cervical cancer cells by regulating *KDM4A* SUMOylation and the *SLC7A11/GPX4* pathway[J]. *Environ Toxicol*, 2024, 39(8): 4207—4220.
- [8] YU D S, SONG X L, YAN C. Oncogenic *miRNA-1908* targets *HDAC10* and promotes the aggressive phenotype of cervical cancer cell[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(5): 402—410.
- [9] YANG B, WANG Z Y, DENG Y P, et al. *LncRNA LAMTOR5-AS1* sponges *miR-210-3p* and regulates cervical cancer progression[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2022, 48(12): 3171—3178.
- [10] LUO Y L, CHEN Y B, JIN H, et al. The suppression of cervical cancer ferroptosis by macrophages: The attenuation of *ALOX15* in cancer cells by macrophages-derived exosomes[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(6): 2645—2662.
- [11] HU S Y, HAO Y P, ZHANG X, et al. *Lactibacillus casei* LH23 suppressed hpv gene expression and inhibited cervical cancer cells[J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2023, 15(3): 443—450.
- [12] 邵骏菁, 杨颖, 王传功, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨桦褐孔菌三萜抗宫颈癌 HeLa 细胞的作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(3): 313—323.
- [13] REN Z T, ZHANG X Y, HAN J Y. Expression and prognostic significance of ferroptosis-related proteins *SLC7A11* and *GPX4* in renal cell carcinoma[J]. *Protein Pept Lett*, 2023, 30(10): 868—876.
- [14] LI Y, CHEN S J, RAO H, et al. microRNA gets a mighty award—the advanced portfolio[J]. *Advanced Science*, 2025, 12(3): 2414625.
- [15] 许文丽, 邢秀月, 徐川微. *miR-188-5p* 靶向 *Nek6* 对宫颈癌细胞的影响及机制[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(1): 142—148.
- [16] 任敬秦, 王静, 周常慧, 等. *miR-30a-5p* 调控 *Skp2* 对宫颈癌细胞恶性进展的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2025, 32(7): 408—417.
- [17] CHEN X Z, HE W X, LUO R G, et al. *KLF14/miR-1283/TFAP2C* axis inhibits *HER2* - positive breast cancer progression via declining tumor cell proliferation[J]. *Mol Carcinog*, 2023, 62(4): 532—545.
- [18] 史乃元, 何涵, 刘彦希, 等. DHA 通过抑制糖酵解促宫颈癌细胞凋亡作用研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(6): 1326—1329.
- [19] 陈露, 李由由, 杲飞莹, 等. 双氢青蒿素通过调节 *SLC7A11/GPX4* 信号通路诱导卵巢癌细胞铁死亡[J]. 中药材, 2024, 47(12): 3103—3107.
- [20] YE H, DING X C, LV X R, et al. *KLF14* directly downregulates the expression of *GPX4* to exert antitumor effects by promoting ferroptosis in cervical cancer[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 21.
- [21] 李颖, 王凯, 胡琼. DHA 对宫颈癌 U14 裸鼠移植瘤的作用及对免疫抑制分子的影响[J]. 中成药, 2019, 41(10): 2492—2495.

(本文编辑:崔兰卿 收稿日期 2026-01-21)