

LncRNA FOXD3-AS1 在卵巢癌 SKOV3 细胞中的表达及对 SKOV3 细胞恶性生物学行为的影响*

黄丽¹ 龚豪² 张春莲¹ 黄润强¹ 任松森¹

(十堰市太和医院·湖北医药学院附属医院 1. 妇科; 2. 肾病内科, 湖北 十堰 442000)

【摘要】 目的 探究 LncRNA FOXD3-AS1 在卵巢癌 SKOV3 细胞中的表达及影响 SKOV3 细胞恶性生物学行为的作用机制。方法 收集 2020 年 10 月~2021 年 6 月我院病理科经过临床确诊的 55 例卵巢癌患者, 利用 RT-qPCR 技术分析卵巢癌组织、癌旁组织、SKOV3 细胞和 IOSE80 细胞中 FOXD3-AS1、miR-325 和 CDCA5 的表达; siRNA 靶向敲降 FOXD3-AS1 和 CDCA5 的表达, 通过细胞克隆形成实验、细胞迁移实验和 Western blot 检测 SKOV3 细胞增殖、迁移及其 EMT 能力。miRanda、TargetScan 和双荧光素酶报告基因实验分析 LncRNA FOXD3-AS1 与 miR-325、miR-325 与 CDCA5 之间的关系。miR-325 inhibitor 转染细胞, 或 pcDNA-FOXD3-AS1 与 miR-325 mimics 共转染细胞后分析 SKOV3 细胞增殖、迁移和 EMT 情况。结果 与 IOSE80 细胞、癌旁组织对比, SKOV3 细胞、卵巢癌组织内 LncRNA FOXD3-AS1、CDCA5 表达上调($P < 0.01$), miR-325 表达下调($P < 0.01$)。siRNA 靶向敲降 FOXD3-AS1 和 CDCA5 的表达抑制了 SKOV3 细胞增殖、迁移与 EMT; LncRNA FOXD3-AS1 的下游作用靶点为 miR-325, miR-325 的作用靶点为 CDCA5; pcDNA-FOXD3-AS1 与 miR-325 mimics 共转染细胞后部分逆转了 miR-325 mimics 转染细胞对 SKOV3 细胞增殖、迁移和 EMT 的抑制作用。结论 LncRNA FOXD3-AS1 在卵巢癌 SKOV3 细胞中表达上调及通过 miR-325/CDCA5 轴影响 SKOV3 细胞恶性生物学行为。

【关键词】 LncRNA FOXD3-AS1; miR-325; CDCA5; 卵巢癌; 增殖; 迁移

【中图分类号】 R737.31 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.09.008

Expression of LncRNA FOXD3-AS1 in ovarian cancer SKOV3 cells and its effect on the malignant biological behavior of SKOV3 cells through miR-325/CDCA5 axis

HUANG Li¹, GONG Hao², ZHANG Chunlian¹, HUANG Runqiang¹, REN Songsen¹

(1. Department of Gynecology, Shiyuan Taihe Hospital, The Affiliated Hospital of Hubei Medical College, Shiyuan 442000, Hubei, China;

2. Department of Nephrology, Shiyuan Taihe Hospital, The Affiliated Hospital of Hubei Medical College, Shiyuan 442000, Hubei, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the expression of LncRNA FOXD3-AS1 in ovarian cancer SKOV3 cells and the mechanism of its influence on the malignant biological behavior of SKOV3 cells. **Methods** Fifty-five patients with ovarian cancer diagnosed clinically in the department of pathology of our hospital from October 2020 to June 2021 were collected. The expression of FOXD3-AS1, miR-325 and CDCA5 in ovarian cancer tissues, paracancer tissues, SKOV3 cells and IOSE80 cells were analyzed by RT-qPCR. The expression of FOXD3-AS1 and CDCA5 was knockdown by siRNA, the proliferation, migration and EMT of SKOV3 cells were detected by cell cloning formation assay, cell migration assay and Western blot. The relationships between LncRNA FOXD3-AS1 and miR-325, miR-325 and CDCA5 were analyzed by miRanda, TargetScan and dual luciferin reporter assay. The proliferation, migration and EMT of SKOV3 cells were analyzed after transfection with miR-325 inhibitor or co-transfection with pcDNA-FoxD3-AS1 and miR-325 mimics. **Results** Compared with IOSE80 cells and paracancer tissues, the expression of LncRNA FOXD3-AS1 and CDCA5 in

基金项目:湖北省卫生健康科研立项项目(WJ2019Q015)

引用本文:黄丽,龚豪,张春莲,等. LncRNA FOXD3-AS1 在卵巢癌 SKOV3 细胞中的表达及对 SKOV3 细胞恶性生物学行为的影响[J]. 西部医学, 2022, 34(9):1288-1295. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.09.008

SKOV3 cells and ovarian cancer tissues was up-regulated ($P < 0.01$), and the expression of miR-325 was down-regulated ($P < 0.01$), siRNA knockdown of FOXD3-AS1 and CDCA5 inhibited SKOV3 cell proliferation, migration and EMT. The downstream target of LncRNA FOXD3-AS1 is miR-325, and the target of miR-325 is CDCA5. After co-transfection with miR-325 mimics, pcDNA-FOXD3-AS1 partially reversed the inhibitory effect of miR-325 mimics transfected cells on proliferation, migration and EMT of SKOV3 cells. **Conclusion** LncRNA FOXD3-AS1 expression was up-regulated in ovarian cancer SKOV3 cells and affected the malignant biological behavior of SKOV3 cells through miR-325 /CDCA5 axis.

[Key words] LncRNA FOXD3-AS1; miR-325; CDCA5; Ovarian cancer; Proliferation; Migration

卵巢癌是最普遍的妇科恶性肿瘤之一,在全世界每年约有 22.5 万新诊断患者,估计有 14 万患者死亡^[1-2]。由于卵巢癌早期症状不典型,筛查方法不可靠,大多数患者诊断时已为晚期,5 年生存率仅 15%~30%。因此深入研究卵巢癌的发病机制具有深远的意义。长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, lncRNA) 是一种长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA^[3],在肿瘤发展中发挥着重要的调控作用^[4-6]。既往研究表明,一些 lncRNA 在卵巢癌中存在异常调节,参与了卵巢癌的发展,如 lncRNA TP73-AS1 通过调控 MMP2 和 MMP9 促进卵巢癌增殖和转移^[7]。LncRNA DANCR 靶向 miR-145 促进卵巢癌肿瘤生长和血管生成^[8]。研究还发现 LncRNA MALAT1 可通过 PI3K-AKT 途径促进上皮性卵巢癌增殖和转移^[9]。以上研究均表明,lncRNA 的异常表达与卵巢癌的恶性发展具有一定的联系。近年有研究发现 lncRNA FOXD3-AS1 与乳腺癌的临床进展相关^[10]。高表达的 lncRNA FOXD3-AS1 通过调控 miR-127-3p/中介复合物亚基 28 轴促进非小细胞肺癌进展^[11]。LncRNA FOXD3-AS1 通过调控 RICTOR 介导 AKT 通路促进肝癌生长和侵袭^[12]。然而,LncRNA FOXD3-AS1 在卵巢癌中的潜在分子机制尚不清楚。因此本研究旨在探讨 lncRNA FOXD3-AS1 在卵巢癌中的表达模式、作用及潜在的功能机制,希望为卵巢癌的治疗找到新的理论靶点。

1 材料与方法

1.1 临床样本 收集 2020 年 10 月~2021 年 6 月我院手术切除的卵巢癌组织及癌旁正常组织共 55 例。所有临床标本立即用液氮快速冷冻,-80℃ 保存至 RNA 分离。所有患者均被告知本研究并签署知情同意书。本研究获得了我院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 卵巢癌细胞系(SKOV3)和人正常卵巢上皮细胞系(IOSE80)取自美国典型菌株保藏中心(ATCC, Manassas, VA, USA)。所有细胞在添加 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(Gibco, Thermo Fisher Scientific)中培养,并在 37℃、5% CO₂ 的湿化培养箱中培养。

1.2.2 RNA 分离和实时荧光定量 PCR 从卵巢癌组织和细胞系中提取 RNA,逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR。引物由上海生物工程有限公司合成,引物序列列表 1。real-time PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,按说明书操作。扩增反应条件包括 95℃ 预变性 1 min, 95℃ 预变性 15 s, 60℃ 预变性 31 s, 45 个循环,95℃ 预变性 15 s, 60℃ 预变性 15 s, 95℃ 预变性 15 s。每个样品重复测试 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 LncRNA FOXD3-AS1, miR-325, CDCA5 的相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')
LncRNA FOXD3-AS1-F	GGTGGAGGAGGCGAGGATG
LncRNA FOXD3-AS1-R	AGCGGACAGACAGGGATTGG
CDCA5-F	AAAGCCACCAACAGAAGG
CDCA5-R	CCAGCCAGAAGTTAAAGG
GAPDH-F	CGGATTTGGTCGTATTGGG
GAPDH-R	TGCTGGAAGATGGTGATGGGATT

1.2.3 细胞转染 专为 FOXD3-AS1、CDCA5 靶向的 siRNA (si-FOXD3-AS1)、(si-CDCA5)、siRNA 对照 (si-control)、miR-325 模拟物 (miR-325 mimic)、模拟物对照 (mimic control)、miR-325 抑制剂 (miR-325 inhibitor)、抑制剂对照 (inhibitor control) 均购自中国广州 RiboBio 公司。SKOV3 细胞以 5×10^4 细胞/孔的密度接种于 6 孔板中,在转染前培养过夜。然后,Lipofectamine™2000 (Thermo Fisher Scientific) 将质粒将瞬时转染到 SKOV3 细胞中。转染 48 h 后收集细胞用于后续分析。

1.2.4 Western blot SKOV3 细胞分为:① siRNA NC、FOXD3-AS1 siRNA、CDCA5 siRNA 组。② inhibitor control、miR-325 inhibitor 组。③ pcDNA-3.1 (+) + mimics control、pcDNA-FOXD3-AS1 + mimics control、pcDNA-3.1 (+) + miR-325 mimics、pcDNA-FOXD3-AS1 + miR-325 mimics 组,并进行转染。来自组织或细胞的蛋白样品经 10% SDS-PAGE 转移到 PVDF 膜上。在 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h 后,用抗 E-cadherin、N-cadherin 的特异性一抗在 4℃ 下孵育过

夜。然后用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔第二抗体 1:5000 检测 2 h。用化学发光法观察抗原-抗体复合物。

1.2.5 双荧光素酶报告基因活性检测实验 在 pGL3 质粒 (Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA) 中合成 FOXD3-AS1 完整片段或其突变体, 并将其克隆到萤火虫荧光素酶基因下游, 命名为 pGL3-FOXD3-AS1 野生型(wt)和 pGL3-FOXD3-AS1 突变型(mut)。同样, 通过 PCR 扩增 CDCA5 中含有预测的 miR-325 结合位点或突变位点的 3' UTR, 并插入 pGL3 质粒, 命名为 pGL3-CDCA5-3' UTR-wt 和 pGL3-CDCA5-3' UTR-mut。转染的 SKOV3 细胞分为: ① pGL3-FOXD3-AS1 wt + mimics control、pGL3-FOXD3-AS1 wt + mimics control + miR-325 mimics、pGL3-FOXD3-AS1 mut + mimics control + mimics control、pGL3-FOXD3-AS1 mut + mimics control + mimics control 组。② pGL3-CDCA5 wt + mimics control、pGL3-CDCA5 wt + mimics control + miR-325 mimics、pGL3-CDCA5 mut + mimics control + mimics control、pGL3-CDCA5 mut + miR-325 mimics 组。使用 Lipofectamine™ 2000 转染后 48 h 收获细胞, 使用双荧光素酶报告基因试剂盒 (Promega Corporation) 测定荧光素酶活性。以肾草荧光素酶活性为内参, 对萤火虫荧光素酶活性进行归一化。

1.2.6 细胞迁移实验 SKOV3 细胞分为: ① siRNA NC、FOXD3-AS1 siRNA、CDCA5 siRNA 组。② inhibitor control、miR-325 inhibitor 组。③ pcDNA-3.1 (+) + mimics control、pcDNA-FOXD3-AS1 + mimics control、pcDNA-3.1 (+) + miR-325 mimics、pcDNA-FOXD3-AS1 + miR-325 mimics 组。转染 48 h 后在 12 孔板中接种密度为 $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 的 SKOV3 细胞。过夜培养后在皿中底部形成单层细胞, 取 200 μL 高压灭菌枪头垂直于孔板进行线性划痕。划线完成后使用无菌 PBS 清洗 3 次, 去除划下的细胞, 更换新鲜无血清或低血清 (< 2%) 的培养基。细胞放入 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养。然后在适当的时间点, 如 0、48 h 后取出细胞, 在显微镜下观察并拍照。使用 Image J 软件打开图片后, 随机划取 6 至 8 条水平线, 计算细胞间距离的均值。

1.2.7 细胞克隆形成实验 SKOV3 细胞分为: siRNA NC、FOXD3-AS1 siRNA、CDCA5 siRNA 组; inhibitor control、miR-325 inhibitor 组; pcDNA-3.1 (+) + mimics control、pcDNA-FOXD3-AS1 + mimics control、pcDNA-3.1 (+) + miR-325 mimics、pcDNA-FOXD3-AS1 + miR-325 mimics 组并进行转染。取对

数生长期的各组细胞, 分别用 0.25% 胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞, 并把细胞悬浮在 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中备用。将细胞悬液稀释后接种在培养皿中, 并轻轻转动, 使细胞分散均匀。置 37°C 5% CO₂ 及饱和湿度的细胞培养箱中培养。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时, 弃去上清液, 用 PBS 小心浸洗 2 次。加 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min。然后去固定液, 加适量 GIMSA 应用染色液染 10 min, 然后用流水缓慢洗去染色液, 在显微镜 (低倍镜) 计数大于 10 个细胞的克隆数。

1.3 统计学分析 采用 GradPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。所有定量数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组或两组以上的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA FOXD3-AS1、miR-325 和 CDCA5 在卵巢癌组织和细胞中的差异表达 与癌旁组织相比, 卵巢癌组织中 FOXD3-AS1 相对基因表达上调 ($t = 26.16, P < 0.01$), CDCA5 相对基因表达上调 ($t = 27.03, P < 0.01$), miR-325 相对基因表达下调 ($t = 25.43, P < 0.01$); 与 IOSE80 细胞相比, SKOV3 细胞中 FOXD3-AS1 相对基因表达上调 ($t = 22.68, P < 0.01$), CDCA5 相对基因表达上调 ($t = 23.54, P < 0.01$), miR-325 相对基因表达下调 ($t = 19.67, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 LncRNA FOXD3-AS1 组、miR-325 组和 CDCA5 组在卵巢癌组织和细胞中的差异表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Differential expression of LncRNA FoxD3-AS1, miR-325 and CDCA5 in ovarian cancer tissues and cells

项目	FOXD3-AS1 组	miR-325 组	CDCA5 组
卵巢癌组织	2.56 ± 0.42 ^①	0.34 ± 0.07 ^①	3.02 ± 0.78 ^①
癌旁组织	1.08 ± 0.23	1.27 ± 0.83	1.35 ± 0.29
SKOV3 细胞	2.89 ± 0.75 ^②	0.56 ± 0.16 ^②	2.82 ± 0.93 ^②
IOSE80 细胞	1.48 ± 0.34	1.72 ± 0.34	0.94 ± 0.07

注: 与癌旁组织相比, ① $P < 0.01$; 与 IOSE80 细胞相比, ② $P < 0.01$

2.2 敲减 FOXD3-AS1 表达抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移及 EMT 与 siRNA NC 组相比, FOXD3-AS1 siRNA 组 FOXD3-AS1 基因相对表达显著下调 ($t = 28.93, P < 0.01$); 与 siRNA NC 组相比, FOXD3-AS1 siRNA 组 SKOV3 细胞克隆数目显著减少 ($t = 8.06, P < 0.05$), E-cadherin/GAPDH 比值上调 ($t = 18.45, P < 0.01$), N-cadherin/GAPDH 比值下调 ($t = 19.82, P < 0.01$), 细胞划痕愈合率降低 ($t = 8.23, P < 0.05$), 结果说明敲减 FOXD3-AS1 表达抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移及 EMT。见图 1、表 3。

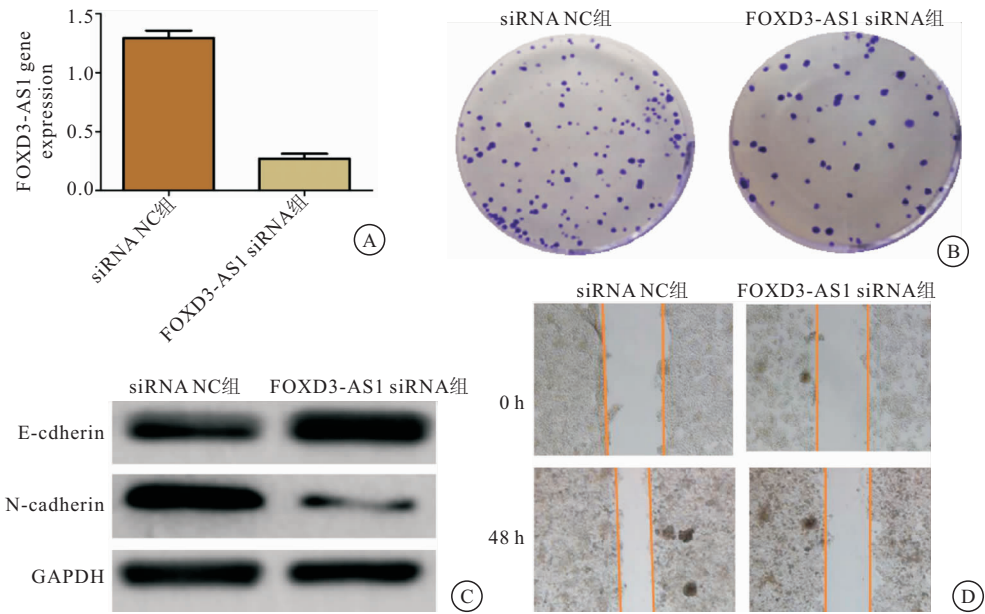


图 1 敲减 FOXD3-AS1 表达抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移及 EMT

Figure 1 Knockdown of FOXD3-AS1 expression inhibited SKOV3 cell proliferation, migration and EMT

注: A. RT-qPCR 检测 FOXD3-AS1 基因表达; B. 细胞克隆形成实验检测 SKOV3 细胞增殖; C. Western blot 检测 SKOV30 细胞 EMT 蛋白相对表达; D. 细胞划痕愈合实验检测 SKOV3 细胞迁移情况

表 3 敲减 FOXD3-AS1 表达抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移及 EMT($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Knockdown of FOXD3-AS1 expression inhibited SKOV3 cell proliferation, migration and EMT

组别	细胞克隆数目(个)	细胞划痕愈合率($\times 10^{-2}$)	N-cadherin 表达量	E-cadherin 表达量
siRNA NC 组	53.24 \pm 9.14	48.38 \pm 8.34	1.12 \pm 0.64	0.98 \pm 0.23
FOXD3-AS1 siRNA 组	36.45 \pm 8.42 ^①	23.15 \pm 7.54 ^①	0.34 \pm 0.13 ^②	1.76 \pm 0.27 ^②

注: 与 siRNA NC 组相比, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$

2.3 LncRNA FOXD3-AS1 与 miR-325 的靶向关系

FOXD3-AS1 和 miR-325 之间的结合位点, 见图 2。pGL3-FOXD3-AS1 wt+miR-325 mimics 组细胞荧光素酶活性与 pGL3-FOXD3-AS1 wt+mimics control 组相比显著下调($t = 19.27, P < 0.01$), pGL3-FOXD3-AS1 mut+miR-325 mimics 组细胞荧光素酶活性与 pGL3-FOXD3-AS1 mut+mimics control 组相比无显著变化($t = 0.68, P > 0.05$), 见表 4。

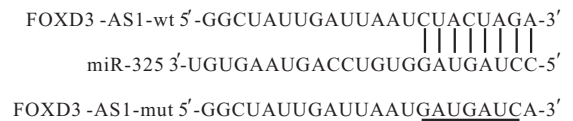


图 2 LncRNA FOXD3-AS1 与 miR-325 的靶向关系

Figure 2 Targeting relationship between lncRNA FoxD3-AS1 and miR-325

表 4 lncRNA FOXD3-AS1 与 miR-325 的靶向关系($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Targeting relationship between lncRNA FOXD3-AS1 and miR-325

项目	pGL3-FOXD3-AS1 wt+mimics control 组	pGL3-FOXD3-AS1 wt+mimics control+miR-325 mimics 组	pGL3-FOXD3-AS1 mut+mimics control 组	pGL3-FOXD3-AS1 mut+miR-325 mimics 组
荧光素酶活性	1.43 \pm 0.17 ^①	0.42 \pm 0.23	1.04 \pm 0.23	1.16 \pm 0.45

注: 与 pGL3-FOXD3-AS1 wt+mimics control 组相比, ① $P < 0.01$

2.4 下调 miR-325 促进 SKOV3 细胞的增殖、侵袭及 EMT 与 inhibitor control 组相比, miR-325 inhibitor 组 miR-325 相对表达显著下调($t = 28.93, P < 0.01$); 与 inhibitor control 组相比, miR-325 inhibitor 组 SKOV3 细胞克隆数目显著增加($t = 9.76, P < 0.05$),

E-cadherin/GAPDH 比值下调($t = 23.78, P < 0.01$), N-cadherin/GAPDH 比值上调($t = 24.52, P < 0.01$), 细胞划痕愈合率上调($t = 9.35, P < 0.05$), 结果说明敲减 miR-325 表达促进 SKOV3 细胞的增殖、迁移及 EMT。见图 3、表 5。

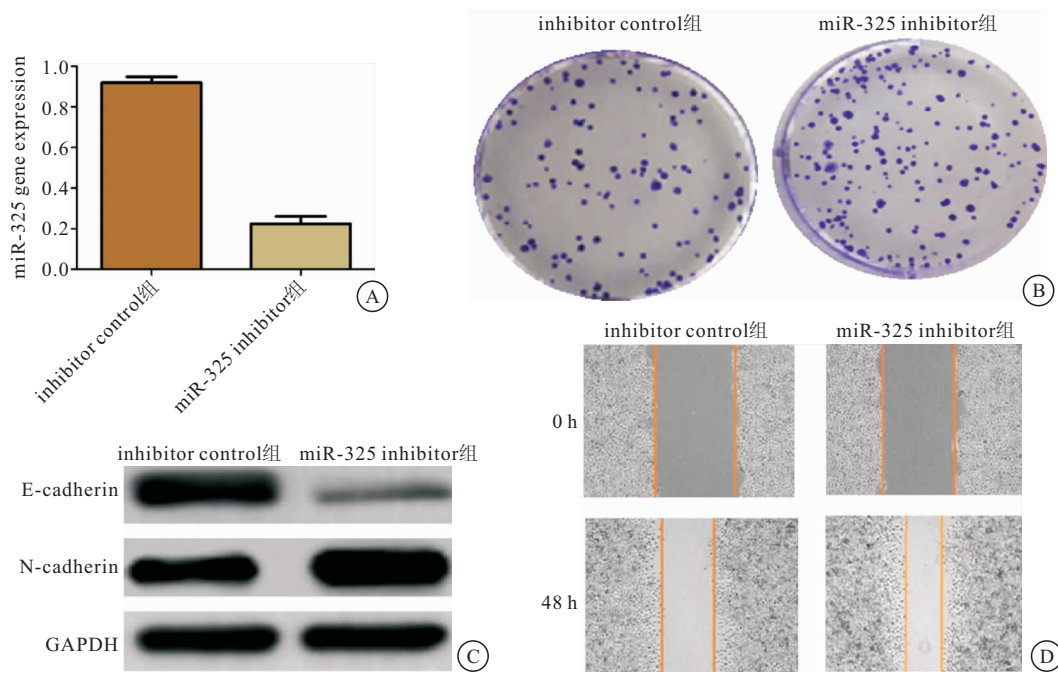


图 3 下调 miR-325 促进 SKOV3 细胞的增殖、侵袭及 EMT

Figure 3 Down-regulation of miR-325 promoted the proliferation, invasion and EMT of SKOV3 cells

注: A. RT-qPCR 检测 miR-325 表达; B. 细胞克隆形成实验检测 SKOV3 细胞增殖; C. Western blot 检测 SKOV30 细胞 EMT 蛋白相对表达; D. 细胞划痕愈合实验检测 SKOV3 细胞迁移情况

表 5 下调 miR-325 促进 SKOV3 细胞的增殖、侵袭及 EMT($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Down-regulation of miR-325 promoted the proliferation, invasion and EMT of SKOV3 cells

组别	细胞克隆数目(个)	细胞划痕愈合率($\times 10^{-2}$)	N-cadherin 表达量	E-cadherin 表达量
inhibitor control 组	76.89±8.15	43.78±7.12	0.97±0.12	1.35±0.78
miR-325 inhibitor 组	120.54±12.35 ^①	63.87±6.15 ^①	2.03±0.45 ^②	0.21±0.02 ^②

注:与 inhibitor control 组相比,① $P < 0.05$,② $P < 0.01$

2.5 上调 LncRNA FOXD3-AS1 通过 miR-325 促进 SKOV3 细胞的增殖、迁移及 EMT 与 pcDNA-3.1 (+)+mimics control 组相比,pcDNA-FOXD3-AS1+mimics control 组细胞克隆数目显著增加($t=26.53, P < 0.01$),细胞划痕愈合率上升($t=8.21, P < 0.05$),N-cadherin/GAPDH 比值显著上调($t=18.26, P < 0.01$),E-cadherin/GAPDH 比值显著下调($t=19.65, P < 0.01$);pcDNA-3.1(+)+miR-325 mimics 组细胞克隆数目显著减少($t=20.14, P < 0.01$),细胞划痕愈

合率降低($t=10.02, P < 0.05$),N-cadherin/GAPDH 比值显著下调($t=22.45, P < 0.01$),E-cadherin/GAPDH 比值显著上调($t=25.23, P < 0.01$);与 pcDNA-3.1 (+)+miR-325 mimics 组相比,pcDNA-FOXD3-AS1+miR-325 mimics 组细胞克隆数目显著增加($t=7.98, P < 0.05$),细胞划痕愈合率上升($t=9.23, P < 0.05$),N-cadherin/GAPDH 比值显著上调($t=27.54, P < 0.01$),E-cadherin/GAPDH 比值显著下调($t=24.83, P < 0.01$),见表 6、图 4。

表 6 上调 LncRNA FOXD3-AS1 通过 miR-325 促进 SKOV3 细胞的增殖、迁移及 EMT($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Up-regulation of LncRNA FOXD3-AS1 promoted SKOV3 cell proliferation, migration and EMT through miR-325

组别	细胞克隆数目(个)	细胞划痕愈合率($\times 10^{-2}$)	N-cadherin 表达量	E-cadherin 表达量
pcDNA-3.1(+)+mimics control 组	78.95±9.34	50.23±8.54	1.01±0.05	0.92±0.03
pcDNA-FOXD3-AS1+mimics control 组	145.78±10.23 ^②	70.85±9.78 ^①	2.32±0.67 ^②	0.23±0.05 ^②
pcDNA-3.1(+)+miR-325 mimics 组	43.56±6.78 ^②	20.12±6.54 ^①	0.21±0.04 ^②	1.87±0.21 ^②
pcDNA-FOXD3-AS1+miR-325 mimics 组	75.68±8.72 ^③	38.79±3.56 ^③	0.93±0.43 ^④	0.86±0.04 ^④

注:与 pcDNA-3.1(+)+mimics control 组相比,① $P < 0.05$,② $P < 0.01$;与 pcDNA-3.1(+)+miR-325 mimics 组相比,③ $P < 0.05$,④ $P < 0.01$

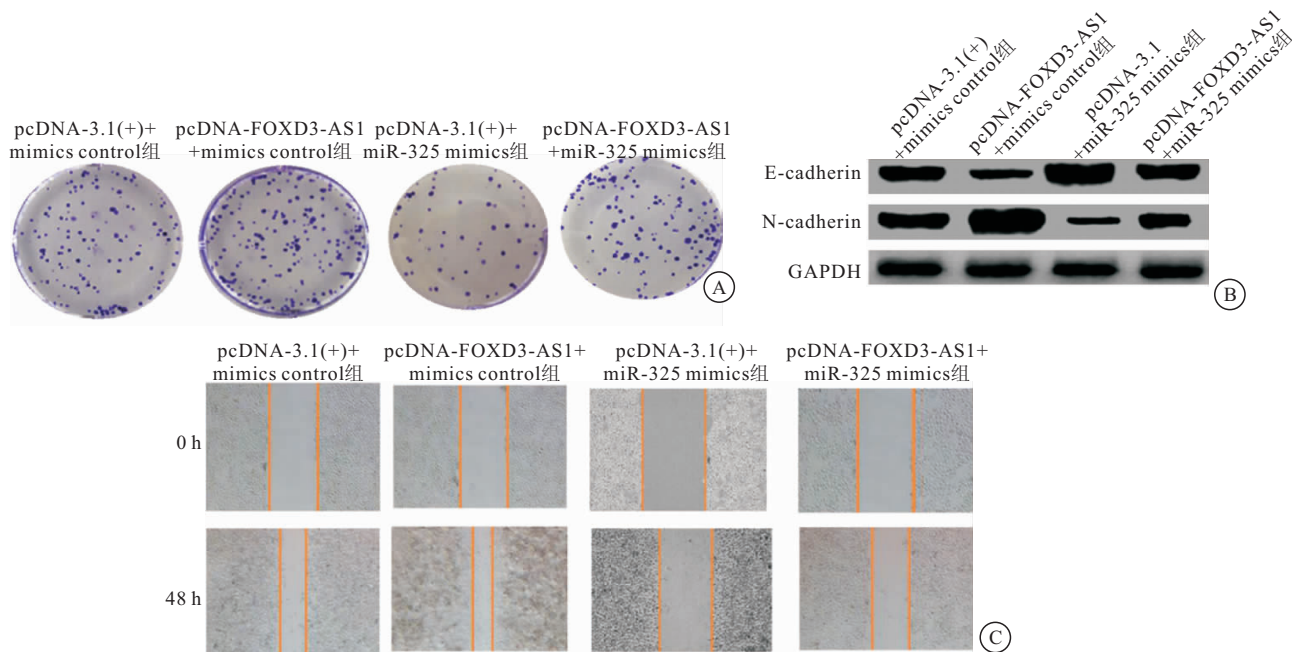


图 4 上调 LncRNA FOXD3-AS1 通过 miR-325 促进 SKOV3 细胞的增殖、迁移及 EMT

Figure 4 Upregulation of LncRNA FOXD3-AS1 promoted SKOV3 cell proliferation, migration and EMT through miR-325

注: A. 细胞克隆形成实验检测 SKOV3 细胞增殖; B. Western blot 检测 SKOV30 细胞 EMT 蛋白相对表达; C. 细胞划痕愈合实验检测 SKOV3 细胞迁移情况

2.6 miR-325 与 CDCA5 的靶向关系 CDCA5 和 miR-325 之间的结合位点, 见图 5。pGL3-CDCA5 wt+miR-325 mimics 组细胞荧光素酶活性与 pGL3-CDCA5 wt+mimics control 组相比显著下调($t=17.83, P<0.01$); pGL3-CDCA5 mut+miR-325 mimics 组细胞荧光素酶活性与 pGL3-CDCA5 mut+mimics control 组相比无显著变化($t=0.73, P>0.05$)。见表 7。

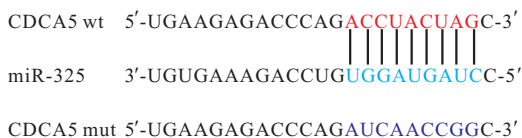


图 5 miR-325 与 CDCA5 的靶向关系

Figure 5 The targeting relationship between miR-325 and CDCA5

表 7 miR-325 与 CDCA5 的靶向关系($\bar{x} \pm s$)

Table 7 The targeting relationship between miR-325 and CDCA5

项目	pGL3-CDCA5wt+mimics control 组	pGL3-CDCA5wt+mimics control+miR-325 mimics 组	pGL3-CDCA5mut+mimics control+mimics control 组	pGL3-CDCA5mut+miR-325 mimics 组
荧光素酶活性	1.36±0.26	0.54±0.32 ^①	1.21±0.09	1.27±0.24

注: 与 pGL3-CDCA5 wt+mimics control 组相比, ^① $P<0.01$

2.7 敲减 CDCA5 表达抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移及 EMT 与 siRNA NC 组相比, CDCA5 siRNA 组 CDCA5 基因相对表达显著下调($t=23.27, P<0.01$); 与 siRNA NC 组相比, CDCA5 siRNA 组 SKOV3 细胞克隆数目显著减少($t=19.26, P<0.01$), E-cadher-

in/GAPDH 比值上调($t=20.15, P<0.01$), N-cadherin/GAPDH 比值下调($t=21.78, P<0.01$), 细胞划痕愈合率降低($t=17.62, P<0.01$), 结果说明敲减 CDCA5 表达抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移及 EMT。见表 8、图 6。

表 8 敲减 CDCA5 表达抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移及 EMT($\bar{x} \pm s$)

Table 8 Knockdown of CDCA5 expression inhibited the proliferation, migration and EMT of SKOV3 cells

组别	细胞克隆数目(个)	细胞划痕愈合率($\times 10^{-2}$)	N-cadherin 表达量	E-cadherin 表达量
siRNA NC 组	53.24±9.14	48.38±8.34	1.35±0.23	0.73±0.14
CDCA5 siRNA 组	23.48±7.63 ^①	18.54±6.21 ^①	0.42±0.56 ^①	1.58±0.52 ^①

注: 与 siRNA NC 组相比, ^① $P<0.01$

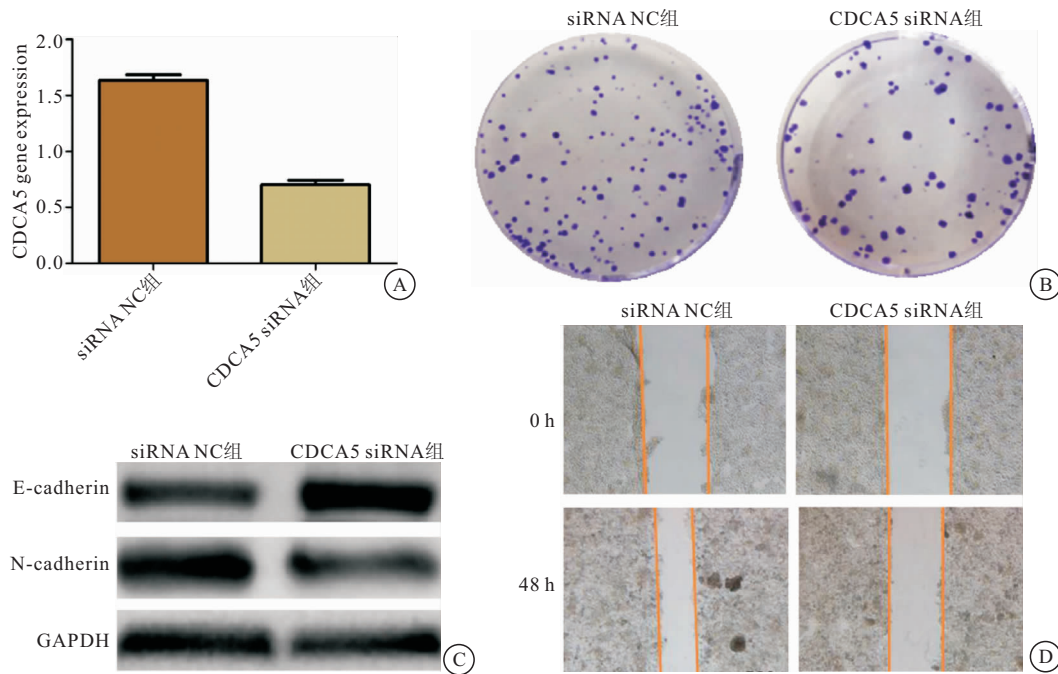


图 6 敲减 CDCA5 表达抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移及 EMT

Figure 6 Knockdown of CDCA5 expression inhibited SKOV3 cell proliferation, migration and EMT

注: A. RT-qPCR 检测 CDCA5 基因表达; B. 细胞克隆形成实验检测 SKOV3 细胞增殖; C. Western blot 检测 SKOV3 细胞 EMT 蛋白相对表达; D. 细胞划痕愈合实验检测 SKOV3 细胞迁移情况

3 讨论

卵巢癌是一种常见的妇科恶性肿瘤^[13],其早期缺乏特定的临床表现,大多数患者在晚期才被诊断出来。研究表明,lncRNA 在肿瘤发生中发挥重要作用,是肿瘤潜在的治疗靶点^[14-16]。最近研究证实 FOXD3-AS1 参与了多种癌症的发展,在恶性胶质瘤、膀胱癌、鼻咽癌等多种肿瘤中调控细胞迁移和侵袭^[17-18]。在上述疾病的发展过程中,FOXD3-AS1 被证实可以调控多个 miRNA 和基因表达,如 microRNA-150、miR-365-5p、CTCF、S100A、Akt 和 E2F1^[19]。此外还有研究表明长链非编码 RNA FOXD3-AS1 通过 miR-135a-5p 调节 SIRT1 促进结肠腺癌进展^[20]。然而 lncRNA FOXD3-AS1 在卵巢癌中的作用及分子机制尚不清楚。因此我们选择了 lncRNA FOXD3-AS1 进行研究,结果发现 FOXD3-AS1 在卵巢癌细胞和组织中高表达,提示 FOXD3-AS1 的异常表达可能与卵巢癌发展有关系。进一步探讨了 FOXD3-AS1 的生物学功能,结果发现敲减 FOXD3-AS1 表达会抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移及 EMT。因此,FOXD3-AS1 可能是卵巢癌发病的关键因素。值得注意的是,先前的一项研究表明,FOXD3-AS1 在鼻咽癌中是一种肿瘤抑制因子,同时它促进结肠腺癌进展^[21],表明 FOXD3-AS1 在不同肿瘤发展中可能作为致癌基因或抑癌基因发挥作用,而本文研究结果显示,FOXD3-AS1 在卵

巢癌中发挥了明显的促癌作用,其作用机制值得进一步深入研究。

前期研究证实,lncRNA 广泛参与 ceRNA 调控网络,可以作为 ceRNA 调控 miRNA 的转录水平。为了进一步研究 FOXD3-AS1 在卵巢癌中的作用机制,本研究使用生物信息学在线软件预测 FOXD3-AS1 的靶基因,结果表明,miR-325 是 FOXD3-AS1 的靶基因。此外,通过双荧光素酶报告基因分析证实 FOXD3-AS1 与 miR-325 直接相互作用。近年来,越来越多的研究证实 microRNA 参与了卵巢癌的生长、侵袭、转移和凋亡。如有研究发现 miRNA-584 通过负调控 LPIN1 抑制卵巢癌的进展^[22]。miR-200c 通过靶向 Neuropilin 1 致奥拉帕尼耐药卵巢癌细胞增敏。此外,miR-142-5p 通过靶向多个抗凋亡基因增强顺铂诱导的卵巢癌细胞凋亡。本研究结果表明,miR-325 在卵巢癌组织和细胞系中降低,miR-325 敲减促进了细胞增殖和迁移,此外,过表达 miR-325 可抑制卵巢癌细胞的增殖和 EMT,逆转了 FOXD3-AS1 过表达的促进作用。以上结果提示 miR-325 作为抑癌因子参与了卵巢癌的增殖和转移,FOXD3-AS1 通过抑制 miR-325 的表达促进卵巢癌细胞增殖和迁移。以往研究表明,miR-325 通过 HSPA12B/PI3K/AKT/Bcl-2 途径促进奥沙利铂诱导的大肠癌细胞毒性^[23]。但尚不清楚 FOXD3-AS1/miR-325 是否通过下游靶向基因来

调控卵巢癌的进展。因此,探索 FOXD3-AS1/miR-325 在卵巢癌中的下游基因是后续研究的重点。在接下来的研究发现 CDCA5 是 miR-325 的下游靶点,有研究表明 CDCA5 与胃癌、膀胱癌等肿瘤发展密切相关^[24]。而本研究结果发现 CDCA5 在卵巢癌细胞和组织中高表达,下调 CDCA5 表达抑制了卵巢癌细胞的增殖、迁移和 EMT 过程,结果也提示 CDCA5 也在卵巢癌的发展进程中发挥了关键作用。然而,FOXD3-AS1/miR-325/CDCA5 在卵巢癌细胞中的功能还有待进一步研究,如在细胞凋亡中的作用等。

综上所述,lncRNA FOXD3-AS1 在卵巢癌组织和细胞系中表达上调。上调 FOXD3-AS1 可促进卵巢癌细胞的生长和转移,下调 FOXD3-AS1 可抑制细胞的增殖和 EMT。软件预测分析表明 miR-325 是 FOXD3-AS1 的靶基因,CDCA5 是 miR-325 的靶基因。进一步研究表明,FOXD3-AS1 通过 miR-325 调控 CDCA5 表达促进了卵巢癌的增殖和迁移。

4 结论

上调 lncRNA FOXD3-AS1 可通过 miR-325/CDCA5 轴促进 SKOV3 细胞生长和转移,这为进一步了解卵巢癌发展的分子机制提供了理论基础。

【参考文献】

[1] 党亚正,黄世高.晚期卵巢癌三维适形和调强放疗研究现状与展望[J].西部医学,2015,27(9):1281-1289.

[2] 陈莹,黄静莹,吕育纯.STAT2 在卵巢癌中表达升高并与卵巢癌患者生存不良有关[J].南方医科大学学报,2020,40(1):34-41.

[3] 王雯智,郑蕾,李虹.lncRNA PVT1 miR-30d 表达与上皮性卵巢癌患者化疗敏感性及其预后的关系[J].西部医学,2020,32(5):687-691.

[4] QIAN X, ZHAO J, YEUNG P Y, *et al.* Revealing lncRNA Structures and Interactions by Sequencing-Based Approaches [J]. Trends Biochem Sci, 2019,44(1):33-52.

[5] ZHU J, FU H, WU Y, *et al.* Function of lncRNAs and approaches to lncRNA-protein interactions [J]. Sci China Life Sci, 2013,56(10):876-85.

[6] HUANG Y. The novel regulatory role of lncRNA-miRNA-mRNA axis in cardiovascular diseases [J]. J Cell Mol Med, 2018,22(12):5768-5775.

[7] WANG X, YANG B, SHE Y, *et al.* The lncRNA TP73-AS1 promotes ovarian cancer cell proliferation and metastasis via modulation of MMP2 and MMP9 [J]. J Cell Biochem. 2018,119(9):7790-7799.

[8] LIN X, YANG F, QI X, *et al.* lncRNA DANCR promotes tumor growth and angiogenesis in ovarian cancer through direct targeting of miR-145 [J]. Mol Carcinog, 2019, 58(12):2286-2296.

[9] JIN Y, FENG S J, QIU S, *et al.* lncRNA MALAT1 promotes proliferation and metastasis in epithelial ovarian cancer via the PI3K-AKT pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017,21(14):3176-3184.

[10] GUAN Y, BHANDARI A, XIA E, *et al.* lncRNA FOXD3-AS1 is associated with clinical progression and regulates cell migration and invasion in breast cancer [J]. Cell Biochem Funct, 2019,37(4):239-244.

[11] ZENG Z L, ZHU H K, HE L F, *et al.* Highly expressed lncRNA FOXD3-AS1 promotes non-small cell lung cancer progression via regulating miR-127-3p/mediator complex subunit 28 axis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020,24(5):2525-2538.

[12] LIU C, ZHANG M, ZHAO J, *et al.* lncRNA FOXD3-AS1 Mediates AKT Pathway to Promote Growth and Invasion in Hepatocellular Carcinoma Through Regulating RICTOR [J]. Cancer Biother Radiopharm. 2020,35(4):292-300.

[13] 张勇,孙丹,黄三秀,等. CIP2A 在卵巢癌组织中的表达及其基因沉默后对肿瘤细胞侵袭和迁移能力的影响 [J]. 西部医学, 2019, 31(5):683-687.

[14] PENG W X, KOIRALA P, MO Y Y. lncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer [J]. Oncogene, 2017,36(41):5661-5667.

[15] 施光清,马李杰,张庭秀,等.长链非编码 RNA:UCA1 在恶性肿瘤中的表达和功能研究进展 [J]. 西南军医,2019,21(4):332-336.

[16] 王灼,刁钰洋,李浩宇,等.长链非编码 RNA NEAT1 在肿瘤中的作用及机制研究进展 [J]. 中国医药科学,2021,11(6):26-30.

[17] CHEN Z H, HU H K, ZHANG C R, *et al.* Down-regulation of long non-coding RNA FOXD3 antisense RNA 1 (FOXD3-AS1) inhibits cell proliferation, migration, and invasion in malignant glioma cells [J]. Am J Transl Res, 2016,8(10):4106-4119.

[18] 张心武,张寅斌,张迪,等. FOXD3-AS1 在进展期远端胃癌中的表达及临床意义 [J]. 中国中西医结合消化杂志,2020,28(5):356-359.

[19] ZHANG D, LEE H, HASPEL J A, *et al.* Long noncoding RNA FOXD3-AS1 regulates oxidative stress-induced apoptosis via sponging microRNA-150 [J]. FASEB J, 2017,31(10):4472-4481.

[20] WU Q, SHI M, MENG W, *et al.* Long noncoding RNA FOXD3-AS1 promotes colon adenocarcinoma progression and functions as a competing endogenous RNA to regulate SIRT1 by sponging miR-135a-5p [J]. J Cell Physiol. 2019,234(12):21889-21902.

[21] HU J, PAN J, LUO Z, *et al.* Long non-coding RNA FOXD3-AS1 silencing exerts tumor suppressive effects in nasopharyngeal carcinoma by downregulating FOXD3 expression via microRNA-185-3p upregulation [J]. Cancer Gene Ther, 2021,28(6):602-618.

[22] YANG L, MA H L. MiRNA-584 suppresses the progression of ovarian cancer by negatively regulating LPIN1 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020,24(3):1062-1071.

[23] ZHANG L, CHEN H, SONG Y, *et al.* MiR-325 Promotes Oxaliplatin-Induced Cytotoxicity Against Colorectal Cancer Through the HSPA12B/PI3K/AKT/Bcl-2 Pathway [J]. Dig Dis Sci, 2021,66(8):2651-2660.

[24] ZHANG Z, SHEN M, ZHOU G. Upregulation of CDCA5 promotes gastric cancer malignant progression via influencing cyclin E1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018,496(2):482-489.