

雷公藤甲素调控 miR-212-3p/ZEB2 通路对卵巢癌细胞紫杉醇耐药的作用机制研究

薛光辉¹, 丁肖华², 周传亚³, 沈 晶¹

1. 濮阳医学高等专科学校, 河南 濮阳 457005

2. 新乡医学院三全学院, 河南 新乡 453000

3. 濮阳市妇幼保健院 妇科, 河南 濮阳 457005

摘要: 目的 基于 miR-212-3p/E 盒结合锌指蛋白 2 (ZEB2) 通路探讨雷公藤甲素 (TPL) 对卵巢癌细胞紫杉醇 (TAX) 耐药的影响。方法 体外培养卵巢癌细胞 SKOV3 及其 TAX 耐药细胞 SKOV3/TAX, 以实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 2 者 miR-212-3p、ZEB2 表达。构建 SKOV3/TAX 移植瘤裸鼠模型, 以 TPL 干预 SKOV3/TAX 细胞及动物后, CCK-8 法检测细胞存活率, 测量肿瘤体积, 筛选其最佳作用浓度/剂量。将 SKOV3/TAX、SKOV3 细胞随机分为对照组、TPL (20 nmol·L⁻¹) 组、inhibitor-NC (100 nmol·L⁻¹) 组、TPL (20 nmol·L⁻¹) + miR-212-3p inhibitor (100 nmol·L⁻¹) 组, 同时以 TAX (0、5、10、20、40、60 nmol·L⁻¹) 处理细胞, 检测 SKOV3/TAX 细胞耐药指数。将 SKOV3/TAX 细胞随机分为对照组、TAX (30 nmol·L⁻¹) 组、TPL (20 nmol·L⁻¹) + TAX (30 nmol·L⁻¹) 组、inhibitor-NC (100 nmol·L⁻¹) 组、TPL (20 nmol·L⁻¹) + TAX (30 nmol·L⁻¹) + miR-212-3p inhibitor (100 nmol·L⁻¹) 组, 干预 24 h; 将 SKOV3/TAX 移植瘤裸鼠随机分为对照组、TAX (8 mg·kg⁻¹, ip 给药) 组、TPL (30 μg·kg⁻¹, ip 给药) + TAX (8 mg·kg⁻¹) 组、inhibitor-NC (5 nmol, 瘤内注射) 组、TPL (30 μg·kg⁻¹) + TAX (8 mg·kg⁻¹) + miR-212-3p inhibitor (5 nmol, 瘤内注射) 组, 干预 2 周。qRT-PCR 法检测细胞和组织中 miR-212-3p、ZEB2 表达, 以 CCK-8、流式细胞实验分别检测细胞增殖、凋亡; 测量肿瘤体积; Western blotting 检测 ZEB2、Bax、Bcl-2、多药耐药蛋白 1 (MDR1) 蛋白表达。结果 与 SKOV3 细胞比较, SKOV3/TAX 细胞 miR-212-3p 降低且 ZEB2 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。TPL 可降低 SKOV3/TAX 细胞耐药指数 ($P < 0.05$), miR-212-3p inhibitor 可逆转 TPL 上述作用 ($P < 0.05$)。与对照组相比, TAX 组细胞存活率、肿瘤体积、Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 凋亡率、Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); TPL+TAX 组细胞存活率、肿瘤体积、ZEB2 mRNA 与蛋白表达、Bcl-2 与 MDR1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 凋亡率、miR-212-3p 表达、Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); inhibitor-NC 组细胞各指标无显著变化。与 TAX 组相比, TPL+TAX 组细胞存活率、肿瘤体积、ZEB2 mRNA 与蛋白表达、Bcl-2 与 MDR1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 凋亡率、miR-212-3p 表达、Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与 TPL+TAX 组相比, TPL+TAX+miR-212-3p inhibitor 组细胞存活率、肿瘤体积、ZEB2 mRNA 与蛋白表达、Bcl-2 与 MDR1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 凋亡率、miR-212-3p 表达、Bax 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。结论 TPL 可拮抗卵巢癌细胞的 TAX 耐药性, 机制可能与调控 miR-212-3p/ZEB2 信号通路相关。

关键词: 雷公藤甲素; miR-212-3p/ZEB2; 卵巢癌; 紫杉醇; 耐药

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2025)08-2145-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.08.009

Mechanism of triptolide regulating miR-212-3p/ZEB2 pathway on paclitaxel resistance in ovarian cancer cells

XUE Guanghui¹, DING Xiaohua², ZHOU Chuanya³, SHEN Jing¹

1. Puyang Medical College, Puyang 457005, China

2. Sanquan College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China

3. Department of Gynecology, Puyang Maternity and Child Care Centers, Puyang 457005, China

Abstract: Objective To investigate the effect of triptolide (TPL) on paclitaxel (TAX) resistance in ovarian cancer cells based on miR-212-3p/zinc finger E-box binding homeobox 2 (ZEB2) pathway. **Methods** SKOV3 ovarian cancer cells and their TAX-resistant cells

收稿日期: 2025-03-04

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20210940)

作者简介: 薛光辉 (1982—), 女, 本科, 高级讲师, 研究方向为医学科研与教学。E-mail: kyrs13@163.com

SKOV3/TAX were cultured *in vitro*. The expression of miR-212-3p and ZEB2 in both cell lines was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). A SKOV3/TAX xenograft nude mouse model was established. After TPL intervention in SKOV3/TAX cells and animals, the cell survival rate was detected by CCK-8 assay, and the tumor volume was measured to screen the optimal concentration/dose. SKOV3/TAX and SKOV3 cells were randomly divided into control group, TPL (20 nmol·L⁻¹) group, inhibitor-NC (100 nmol·L⁻¹) group, and TPL (20 nmol·L⁻¹) + miR-212-3p inhibitor (100 nmol·L⁻¹) group. Meanwhile, the cells were treated with TAX (0, 5, 10, 20, 40, 60 nmol·L⁻¹), and the drug resistance index of SKOV3/TAX cells was detected. SKOV3/TAX cells were randomly divided into control group, TAX (30 nmol·L⁻¹) group, TPL (20 nmol·L⁻¹) + TAX (30 nmol·L⁻¹) group, inhibitor-NC (100 nmol·L⁻¹) group, and TPL (20 nmol·L⁻¹) + TAX (30 nmol·L⁻¹) + miR-212-3p inhibitor (100 nmol·L⁻¹) group, and intervened for 24 h. SKOV3/TAX xenograft nude mice were randomly divided into control group, TAX (8 mg·kg⁻¹, ip) group, TPL (30 μg·kg⁻¹, ip) + TAX (8 mg·kg⁻¹) group, inhibitor-NC (5 nmol, intratumoral injection) group, and TPL (30 μg·kg⁻¹) + TAX (8 mg·kg⁻¹) + miR-212-3p inhibitor (5 nmol, intratumoral injection) group, and intervened for two weeks. The expression of miR-212-3p and ZEB2 in cells and tissues was detected by qRT-PCR. Cell proliferation and apoptosis were detected by CCK-8 and flow cytometry, respectively. The tumor volume was measured. The expression of ZEB2, Bax, Bcl-2, and multidrug resistance protein 1 (MDR1) was detected by Western blotting. **Results** Compared with SKOV3 cells, the expression of miR-212-3p in SKOV3/TAX cells was decreased, and the expression of ZEB2 mRNA was increased ($P < 0.05$). TPL could reduce the drug resistance index of SKOV3/TAX cells ($P < 0.05$), and miR-212-3p inhibitor could reverse the above effect of TPL ($P < 0.05$). Compared with the control group, the cell survival rate, tumor volume, and Bcl-2 protein expression in the TAX group were decreased ($P < 0.05$), and the apoptosis rate and Bax protein expression were increased ($P < 0.05$); in the TPL + TAX group, the cell survival rate, tumor volume, ZEB2 mRNA and protein expression, Bcl-2 and MDR1 protein expression were decreased ($P < 0.05$), and the apoptosis rate, miR-212-3p expression, and Bax protein expression were increased ($P < 0.05$); there were no significant changes in the inhibitor-NC group. Compared with the TAX group, the cell survival rate, tumor volume, ZEB2 mRNA and protein expression, Bcl-2 and MDR1 protein expression in the TPL + TAX group were decreased ($P < 0.05$), while the apoptosis rate, miR-212-3p expression and Bax protein expression were increased ($P < 0.05$). Compared with the TPL + TAX group, the cell survival rate, tumor volume, ZEB2 mRNA and protein expression, Bcl-2 and MDR1 protein expression in the TPL + TAX + miR-212-3p inhibitor group were increased ($P < 0.05$), while the apoptosis rate, miR-212-3p expression and Bax protein expression were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** TPL can antagonize TAX resistance in ovarian cancer cells, and regulating the miR-212-3p/ZEB2 signaling pathway may be its pharmacological mechanism.

Key words: triptolide; miR-212-3p/ZEB2; ovarian cancer; paclitaxel; drug resistance

卵巢癌是妇科常见的病死率很高的一种恶性肿瘤,因起病隐蔽、肿瘤占位不明显,导致患者确诊普遍较晚,治疗效果差、生存率低,对女性生殖系统健康和生命安全构成极大威胁,化疗是其主要临床治疗方法,紫杉醇(TAX)是一线化疗药,但耐药性的产生极大限制其治疗效果,所以提高卵巢癌患者治疗效果的关键是减弱肿瘤耐药性^[1-3]。miR-212-3p是在多种肿瘤发生中起着重要作用的一种非编码微小RNA,具有抑癌作用,可抑制高级别浆液性卵巢癌细胞增殖、集落形成、侵袭和迁移^[4],增强miR-212-3p表达可降低子宫内膜癌细胞TAX耐药性并促进其凋亡^[5],E盒结合锌指蛋白2(ZEB2)是miR-212-3p的下游靶点,在肝癌癌细胞中可被其直接靶向下调,进而减弱TAX耐药性及迁移、侵袭^[6],ZEB2还可参与卵巢癌的发生过程,上调其表达可增强卵巢癌增殖、迁移和侵袭功能^[7],由此可知miR-212-3p/ZEB2可作为拮抗卵巢癌化疗耐药的潜在作用靶点。雷公藤甲素

(TPL)又称雷公藤内酯或雷公藤内酯醇,是提取自卫矛科植物雷公藤中的一种环氧二萜内酯化合物,具有明显抗癌功效,可诱导癌细胞凋亡、自噬细胞死亡、衰老、焦亡等死亡过程^[8-9],并在减轻肿瘤耐药性方面发挥重要作用,TPL可恢复阿霉素耐药白血病细胞对阿霉素的敏感性^[10],另外有研究显示TPL可通过上调miR-328-3p而抑制脑胶质瘤细胞生长^[11],因而推测TPL可能通过调控miR-212-3p/ZEB2通路而减弱卵巢癌细胞的TAX耐药性。本研究通过体外培养人卵巢癌TAX耐药细胞SKOV3/TAX并构建其移植瘤裸鼠模型,基于miR-212-3p/ZEB2通路探讨TPL对卵巢癌细胞TAX耐药的影响。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雌性6~7周龄BALB/c-nu裸鼠,体重15~18g,购自河南省实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(豫)2022-0001,在湿度45%~

65%、温度 22~26 °C 的 SPF 级动物实验室内饲养，自由取食饮水，保持明暗各 12 h 节律照明。本实验获得濮阳医学高等专科学校伦理委员会批准，批件号 PY20240059。

1.2 细胞与主要试剂

雷公藤甲素（批号 111567-202005，质量分数 99.6%）购于中国食品药品检定研究院；人卵巢癌细胞 SKOV3、人卵巢癌 TAX 耐药细胞 SKOV3/TAX，购于上海谷研生物科技有限公司；inhibitor NC（miR-212-3p inhibitor 阴性对照，货号 HY-RS16408）、miR-212-3p inhibitor（货号 HY-RI00442）、转染试剂（货号 HY-K2017），购于美国 MCE 公司；Trizol、兔源抗人 anti-ZEB2、anti-多药耐药蛋白 1（MDR1）、anti- β -actin、anti-Bcl-2 相关 X 蛋白（Bax）、anti-Bcl-2 一抗、一步法实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）试剂盒，购于上海优宁维生物科技股份有限公司；CCK-8 试剂盒、酶标二抗（大鼠抗兔）、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒，购于英国 Abcam 公司。

1.3 主要仪器

BK-2008R 酶标仪（北京倍肯华业科技发展有限公司）；SH800 流式细胞仪（日本索尼株式会社）；165-8033 垂直电泳与转印套装、CFX96Touch 荧光定量 PCR 仪（美国 bio-rad 公司）。

2 方法

2.1 qRT-PCR 检测 miR-212-3p、ZEB2 在 SKOV3、SKOV3/TAX 细胞中的表达

39.5 °C 水浴中解冻 SKOV3、SKOV3/TAX 细胞，以 RPMI 1640 培养基（含 10% 特级胎牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素-链霉素）在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养，采集传代 2 次后的 SKOV3、SKOV3/TAX 细胞沉淀，以 Trizol 提取其中总 RNA，用一步法 qRT-PCR 试剂盒进行 PCR 反应，反应条件与实验步骤参照试剂盒说明书，以 U6 和 β -actin 分别作为 miR-212-3p、ZEB2 的内参，并以此为标准归一量化 SKOV3、SKOV3/TAX 细胞中 miR-212-3p、ZEB2 的相对表达量。引物序列见表 1。

2.2 TPL 最佳作用浓度/剂量筛选

取传代 2 次后的 SKOV3/TAX 细胞接种在 96 孔板中，接种密度为每孔 1×10^4 个，细胞生长 24 h 后以浓度为 0、5、10、20、40、60 nmol·L⁻¹ 的 TPL 处理 24 h^[12]，加入 5 mg·mL⁻¹ 的 CCK-8 试剂孵育

表 1 基因引物序列

Table 1 Gene primer sequences

引物	方向	序列（5'→3'）
ZEB2	F	AACGAGTGC GGATTTGTAACCAG
	R	TTGGCAGTAACAGTTGGGCAAG
β -actin	F	CGACAACGGCTCCGGCATGT
	R	CTAGGGCGGCCCCACGATGGA
miR-212-3p	F	CGCGAGATCAGAAGGTGATT
	R	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACTGGATACGACAGCCAC
U6	F	CTCGCTTCGGCAGCACA
	R	AACGCTTCACGAATTTGCGT

90 min，用酶标仪测出各组细胞吸光度（A）值，计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

参考文献报道方法^[13]建立 SKOV3/TAX 移植瘤裸鼠模型：取传代 2 次的 SKOV3/TAX 细胞，以磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤后制成 5×10^7 个·mL⁻¹ 的细胞悬液，取 100 μ L 与等体积 Matrigel 基质胶混匀后注射到裸鼠右前肢腋窝皮下，6 d 后选长出 50~80 mm³ 大小肿瘤块的裸鼠，随机分为对照组和 TPL 低、中、高剂量（30、60、120 μ g·kg⁻¹）^[14]组，TPL 组裸鼠分别 ip 6、12、24 μ g·mL⁻¹ 的 TPL 药液（溶于 0.9% 氯化钠溶液，注射体积 5 mL·kg⁻¹，每天 1 次），对照组裸鼠 ip 5 mL·kg⁻¹ 0.9% 氯化钠溶液，干预 2 周后测量各组裸鼠肿瘤最长径和最短径，计算肿瘤体积。

$$\text{肿瘤体积} = \text{最长径} \times \text{最短径}^2 / 2$$

2.3 TPL 对 SKOV3/TAX 细胞耐药性的影响

取传代 2 次的 SKOV3/TAX 细胞，接种在 4 块 96 孔板中，接种密度为每孔 1×10^4 个，随机分为对照组、TPL（20 nmol·L⁻¹）组、inhibitor-NC（100 nmol·L⁻¹）组、TPL（20 nmol·L⁻¹）+ miR-212-3p inhibitor（100 nmol·L⁻¹）组，细胞生长 24 h 后，进行转染及加药操作，各组同时以浓度为 0、5、10、20、40、60 nmol·L⁻¹ 的 TAX 处理 24 h^[15]。以同样方法解冻、复苏、培养 SKOV3 细胞，接种在 96 孔板中，接种密度为每孔 1×10^4 个，分组、转染、给药方式均同 SKOV3/TAX 细胞，用 CCK-8 试剂盒测定上述各组细胞存活率，分析获得各组细胞 TAX 的半数抑制浓度（IC₅₀），算出各组 SKOV3/TAX 细胞耐药指数^[16]。

$$\text{耐药指数} = \text{SKOV3/TAX 细胞 IC}_{50} / \text{SKOV3 细胞 IC}_{50}$$

2.4 SKOV3/TAX 细胞及其移植瘤裸鼠分组处理及标本采集

取传代 2 次的 SKOV3/TAX 细胞接种在 24 孔板, 接种密度为每孔 1×10^5 个, 生长 24 h 后随机分为对照组、TAX ($30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、TPL ($20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + TAX ($30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、inhibitor-NC ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、TPL ($20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + TAX ($30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + miR-212-3p inhibitor ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 进行转染及加药操作, 对照组细胞不做处理, 细胞处理 24 h 后收集细胞, 进行后续 qRT-PCR、Western blotting、凋亡检测。

按“2.2”项中方法构建 SKOV3/TAX 移植瘤裸鼠, 随机分为对照组、TAX 组、TPL+TAX 组、inhibitor-NC 组、TPL+TAX+miR-212-3p inhibitor 组, TAX 组裸鼠 ip $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 TAX (溶于 0.9% 氯化钠溶液, 注射体积 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) [13], TPL+TAX 组裸鼠 ip $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 TPL 和 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 TAX (共溶于 0.9% 氯化钠溶液, 注射体积 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), inhibitor-NC 组裸鼠瘤内注射 5 nmol inhibitor-NC (溶于 $100 \mu\text{L}$ 0.9% 氯化钠溶液), TPL+TAX+miR-212-3p inhibitor 组裸鼠 ip $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 TPL 和 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 TAX 的同时瘤内注射 5 nmol miR-212-3p inhibitor (溶于 $100 \mu\text{L}$ 0.9% 氯化钠溶液), 每天给药 1 次, 各组裸鼠干预 2 周后检测肿瘤体积, 然后处死裸鼠后剪开右腋处皮肤, 取出肿瘤组织, 剪下约 300 mg 存在液氮中, 进行后续 qRT-PCR、Western blotting 检测。

2.5 qRT-PCR、Western blotting 实验检测各组 SKOV3/TAX 细胞及裸鼠肿瘤组织 miR-212-3p、ZEB2 表达

收集“2.4”项中分组处理后的各组 SKOV3/TAX 细胞, 以 Trizol 分别提取其中总 RNA 后, 按“2.1”项中方法进行 qRT-PCR 反应, 检测各组 miR-212-3p、ZEB2 mRNA 相对表达。

收集“2.4”项中分组处理后的各组 SKOV3/TAX 细胞并取出“2.4”项中冻存在液氮中的肿瘤组织, 以 RAPI 试剂分别提取其中总蛋白后用 BCA 法测定其浓度, 在沸水浴内变性后每组取 $30 \mu\text{g}$ 进行电泳、湿式电转、封闭, 剪下各组 ZEB2、Bax、Bcl-2、MDR1、 β -actin 蛋白孵育相应一抗、二抗后显色, 拍照后用 Image J 软件定量其灰度值并量化其相对表达 (以 β -actin 蛋白为内源性对照)。

2.6 CCK-8、流式细胞实验分别检测各组 SKOV3/TAX 细胞增殖、凋亡

取传代 2 次的 SKOV3/TAX 细胞接种在 96 孔板中, 接种密度为每孔 1×10^4 个, 按“2.4”项中方法分组处理后进行 CCK-8 实验, 测出各组细胞存活率, 测定方法见“2.2”项。

收集“2.4”项中分组处理后的各组 SKOV3/TAX 细胞, 以 PBS 洗涤后制为 $5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液, 每组取 1 mL 加入 Annexin V-FITC、PI 分别孵育, 按 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书中方法用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

2.7 统计学分析

数据以软件 SPSS 26.0 进行统计学分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较进行单因素方差分析, 组间两两进一步差异比较进行 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 miR-212-3p、ZEB2 在 SKOV3、SKOV3/TAX 细胞中的表达

与 SKOV3 细胞相比, SKOV3/TAX 细胞 miR-212-3p 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$), ZEB2 mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 miR-212-3p、ZEB2 mRNA 在 SKOV3、SKOV3/TAX 细胞中的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Relative expression of miR-212-3p and ZEB2 mRNA in SKOV3 and SKOV3/TAX cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

细胞	miR-212-3p/U6	ZEB2/ β -actin
SKOV3	0.98 ± 0.20	1.03 ± 0.19
SKOV3/TAX	$0.29 \pm 0.08^*$	$2.31 \pm 0.26^*$

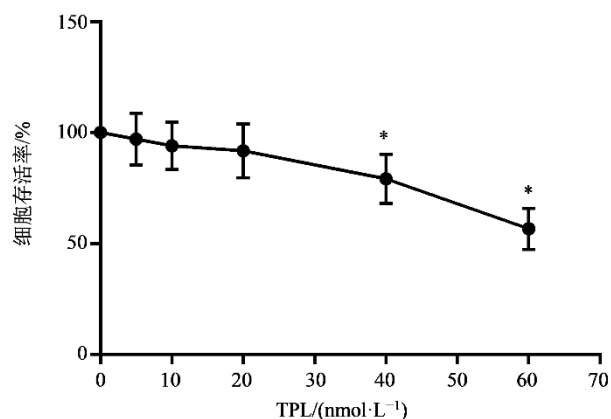
与 SKOV3 细胞比较: $^*P < 0.05$ 。

$^*P < 0.05$ vs SKOV3 cells.

3.2 TPL 最佳作用浓度/剂量筛选结果

如图 1 所示, 与 $0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TPL 组比较, 40 、 $60 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TPL 显著降低 SKOV3/TAX 细胞存活率 ($P < 0.05$), 低于 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TPL 对 SKOV3/TAX 细胞存活率无明显影响。

如图 2、表 3 所示, 与对照组比较, 60 、 $120 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ TPL 组肿瘤体积显著减小 ($P < 0.05$), $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ TPL 组肿瘤体积无明显变化。为排除 TPL 细胞毒性对实验结果的影响, 进而有力证明 TPL 对 SKOV3/TAX 细胞增殖的影响是通过增强其对 TAX 的敏感性来实现, 后续实验以 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 TPL 处理 SKOV3/TAX 细胞, 以 $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量的 TPL 处理 SKOV3/TAX 移植瘤裸鼠。



与 0 nmol·L⁻¹ TPL 组比较: **P*<0.05。
**P*<0.05 vs 0 nmol·L⁻¹ TPL group.

图 1 不同浓度 TPL 对 SKOV3/TAX 细胞增殖的影响
($\bar{x} \pm s$, *n*=6)

Fig. 1 Effects of different concentrations of TPL on proliferation of SKOV3/TAX cells ($\bar{x} \pm s$, *n*=6)

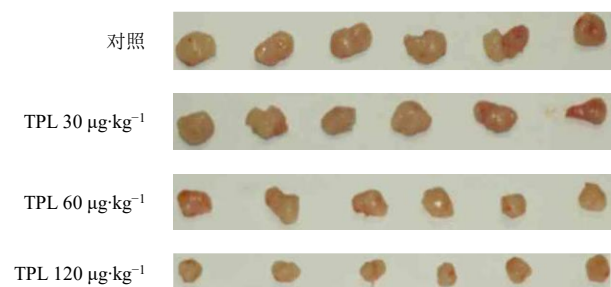


图 2 不同剂量 TPL 干预下 SKOV3/TAX 移植瘤裸鼠肿瘤
Fig. 2 Tumor of SKOV3/TAX nude mice implanted with different doses of TPL intervention

表 3 不同剂量 TPL 对 SKOV3/TAX 移植瘤裸鼠肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n*=6)

Table 3 Effects of different doses of TPL on tumor growth in SKOV3/TAX transplanted tumor-bearing nude mice ($\bar{x} \pm s$, *n*=6)

组别	剂量/(μg·kg ⁻¹)	肿瘤体积/mm ³
对照	—	965.80±93.46
TPL	30	920.13±86.57
	60	763.26±54.74*
	120	541.95±42.32*

与对照组比较: **P*<0.05。
**P*<0.05 vs control group.

3.3 TPL 对 SKOV3/TAX 细胞 TAX 耐药指数的影响
与对照组相比, TPL 组细胞耐药指数显著降低 (*P*<0.05), inhibitor-NC 组耐药指数无明显变化; 与 TPL 组相比, TPL+miR-212-3p inhibitor 组细胞耐药指数显著升高 (*P*<0.05)。结果见表 4。

表 4 各组 SKOV3/TAX 细胞耐药指数 ($\bar{x} \pm s$, *n*=6)

Table 4 Drug resistance index of SKOV3/TAX cells in each group ($\bar{x} \pm s$, *n*=6)

组别	剂量/(nmol·L ⁻¹)	耐药指数
对照	—	3.06±0.52
TPL	20	1.04±0.31*
miR-212-3p-NC	100	3.08±0.49
TPL+miR-212-3p inhibitor	20+100	2.96±0.45 [#]

与对照组比较: **P*<0.05; 与 TPL 组比较: [#]*P*<0.05。
**P*<0.05 vs control group; [#]*P*<0.05 vs TPL group.

3.4 各组 SKOV3/TAX 细胞及其移植瘤裸鼠肿瘤组织 miR-212-3p、ZEB2 表达检测结果

与对照组相比, TPL+TAX 组 SKOV3/TAX 细胞及肿瘤组织中 ZEB2 mRNA 与蛋白表达显著降低 (*P*<0.05), miR-212-3p 表达显著升高 (*P*<0.05); TAX 组、inhibitor-NC 组 SKOV3/TAX 细胞及肿瘤组织中 miR-212-3p、ZEB2 mRNA 与蛋白表达无显著变化。与 TAX 组相比, TPL+TAX 组 SKOV3/TAX 细胞及肿瘤组织中 ZEB2 mRNA 与蛋白表达显著降低 (*P*<0.05), miR-212-3p 表达显著升高 (*P*<0.05)。与 TPL+TAX 组相比, TPL+TAX+miR-212-3p inhibitor 组 SKOV3/TAX 细胞及肿瘤组织中 ZEB2 mRNA 与蛋白表达显著升高 (*P*<0.05), miR-212-3p 表达显著降低 (*P*<0.05)。结果见图 3、表 5。

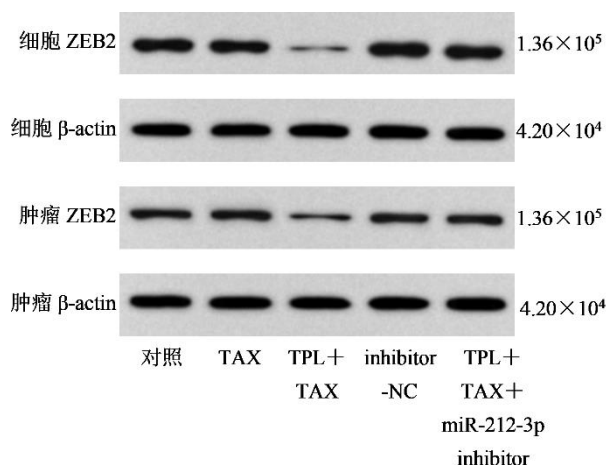


图 3 Western blotting 检测各组 SKOV3/TAX 细胞及其移植瘤裸鼠肿瘤组织 ZEB2 蛋白表达

Fig. 3 ZEB2 protein expression in SKOV3/TAX cells and transplanted nude mouse tumor tissues detected by Western blotting

表 5 各组 SKOV3/TAX 细胞及其移植瘤裸鼠肿瘤组织 *miR-212-3p*、*ZEB2* 相对表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 5 Relative expression of *miR-212-3p* and *ZEB2* in SKOV3/TAX cells and transplanted nude mouse tumor tissues of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度/(nmol·L ⁻¹)	细胞		
		<i>miR-212-3p</i> /U6	<i>ZEB2</i> /β-actin	<i>ZEB2</i> /β-actin
对照	—	0.99±0.12	1.01±0.15	0.91±0.16
TAX	30	0.92±0.10	1.07±0.13	0.96±0.14
TPL+TAX	20+30	2.43±0.17 ^{*#}	0.32±0.08 ^{*#}	0.17±0.05 ^{*#}
inhibitor-NC	100	0.98±0.11	1.02±0.14	0.92±0.17
TPL+TAX+ <i>miR-212-3p</i> inhibitor	20+30+100	1.03±0.14 [△]	0.97±0.16 [△]	0.88±0.15 [△]

组别	剂量	肿瘤组织		
		<i>miR-212-3p</i> /U6	<i>ZEB2</i> /β-actin	<i>ZEB2</i> /β-actin
对照	—	1.00±0.18	0.97±0.13	0.81±0.11
TAX	8 mg·kg ⁻¹	0.93±0.15	1.03±0.15	0.87±0.10
TPL+TAX	30 μg·kg ⁻¹ +8 mg·kg ⁻¹	2.46±0.21 ^{*#}	0.28±0.07 ^{*#}	0.22±0.06 ^{*#}
inhibitor-NC	5 nmol	1.01±0.20	0.98±0.14	0.82±0.12
TPL+TAX+ <i>miR-212-3p</i> inhibitor	30 μg·kg ⁻¹ +8 mg·kg ⁻¹ +5 nmol	1.04±0.19 [△]	0.94±0.11 [△]	0.78±0.09 [△]

与对照组比较: ^{*} $P<0.05$; 与 TAX 组比较: [#] $P<0.05$; 与 TPL+TAX 组比较: [△] $P<0.05$ 。

^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs TAX group; [△] $P<0.05$ vs TPL+TAX group.

3.5 各组 SKOV3/TAX 细胞增殖、凋亡及其移植瘤裸鼠肿瘤生长检测结果

与对照组相比, TAX 组、TPL+TAX 组 SKOV3/TAX 细胞存活率、肿瘤体积显著降低 ($P<0.05$), 凋亡率显著升高 ($P<0.05$); inhibitor-NC 组 SKOV3/TAX 细胞存活率、凋亡率与肿瘤体积无

显著变化。与 TAX 组相比, TPL+TAX 组 SKOV3/TAX 细胞存活率、肿瘤体积显著降低 ($P<0.05$), 凋亡率显著升高 ($P<0.05$)。与 TPL+TAX 组相比, TPL+TAX+*miR-212-3p* inhibitor 组 SKOV3/TAX 细胞存活率、肿瘤体积显著升高 ($P<0.05$), 凋亡率显著降低 ($P<0.05$)。结果见图 4 和表 6、7。

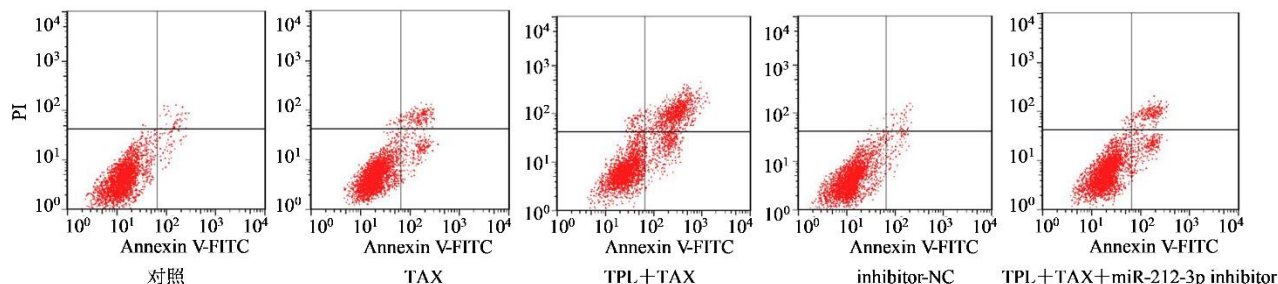


图 4 各组 SKOV3/TAX 细胞的流式细胞检测结果

Fig. 4 Flow cytometry results of SKOV3/TAX cells in each group

表 6 各组 SKOV3/TAX 细胞存活率、凋亡率与肿瘤体积 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 6 SKOV3/TAX cell viability, apoptosis rate and tumor volume in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度/(nmol·L ⁻¹)	细胞存活率/%	凋亡率/%
对照	30	100.00±0.00	1.32±0.43
TAX	20+30	73.16±8.20 [*]	28.65±1.29 [*]
TPL+TAX	100	41.25±5.74 ^{*#}	59.38±3.63 ^{*#}
inhibitor-NC	20+30+100	106.01±12.63	1.41±0.45
TPL+TAX+ <i>miR-212-3p</i> inhibitor	30	82.74±10.45 [△]	23.91±2.74 [△]

与对照组比较: ^{*} $P<0.05$; 与 TAX 组比较: [#] $P<0.05$; 与 TPL+TAX 组比较: [△] $P<0.05$ 。

^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs TAX group; [△] $P<0.05$ vs TPL+TAX group.

表 7 肿瘤体积 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 7 Tumor volume ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量	肿瘤体积/mm ³
对照	30	973.85±87.24
TAX	—	812.14±62.59*
TPL+TAX	8 mg·kg ⁻¹	526.32±69.84*#
inhibitor-NC	30 μg·kg ⁻¹ + 8 mg·kg ⁻¹	985.06±101.73
TPL+TAX+miR-212-3p inhibitor	5 nmol	869.50±83.46 [△]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与 TAX 组比较: # $P<0.05$; 与 TPL+TAX 组比较: [△] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs TAX group; [△] $P<0.05$ vs TPL+TAX group.

3.6 各组 SKOV3/TAX 细胞及其移植瘤裸鼠肿瘤组织凋亡、耐药相关蛋白表达检测结果

与对照组相比, TAX 组细胞及肿瘤组织 Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$), Bax 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$), MDR1 表达无显著变化; TPL+TAX 组细胞及肿瘤组织 Bcl-2、MDR1 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$), Bax 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$); inhibitor-NC 组细胞及肿瘤组织 Bcl-2、MDR1、Bax 蛋白表达无显著变化。与 TAX 组相比, TPL+TAX 组细胞及肿瘤组织 Bcl-2、MDR1 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$), Bax 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$)。与 TPL+TAX 组相比, TPL+TAX+miR-212-3p inhibitor 组细胞及肿瘤组织 Bcl-2、MDR1 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$), Bax 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$)。结果见图 5、表 8。

表 8 各组 SKOV3/TAX 细胞及其移植瘤裸鼠肿瘤组织凋亡、耐药相关蛋白相对表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 8 SKOV3/TAX cells and transplanted nude mice expressed apoptosis and drug-resistance related proteins in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度/(nmol·L ⁻¹)	细胞		
		Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin	MDR1/β-actin
对照	—	0.14±0.02	0.85±0.08	0.93±0.09
TAX	30	0.25±0.03*	0.71±0.05*	0.95±0.10
TPL+TAX	20+30	0.73±0.07*#	0.29±0.04*#	0.30±0.06*#
inhibitor-NC	100	0.13±0.02	0.84±0.09	0.94±0.08
TPL+TAX+miR-212-3p inhibitor	20+30+100	0.29±0.04 [△]	0.67±0.06 [△]	0.91±0.07 [△]

组别	剂量	肿瘤组织		
		Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin	MDR1/β-actin
对照	—	0.16±0.01	0.79±0.07	0.87±0.10
TAX	8 mg·kg ⁻¹	0.28±0.03*	0.64±0.05*	0.89±0.09
TPL+TAX	30 μg·kg ⁻¹ + 8 mg·kg ⁻¹	0.75±0.07*#	0.23±0.02*#	0.25±0.03*#
inhibitor-NC	5 nmol	0.17±0.02	0.78±0.06	0.86±0.11
TPL+TAX+miR-212-3p inhibitor	30 μg·kg ⁻¹ + 8 mg·kg ⁻¹ + 5 nmol	0.31±0.04 [△]	0.61±0.05 [△]	0.84±0.08 [△]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与 TAX 组比较: # $P<0.05$; 与 TPL+TAX 组比较: [△] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs TAX group; [△] $P<0.05$ vs TPL+TAX group.

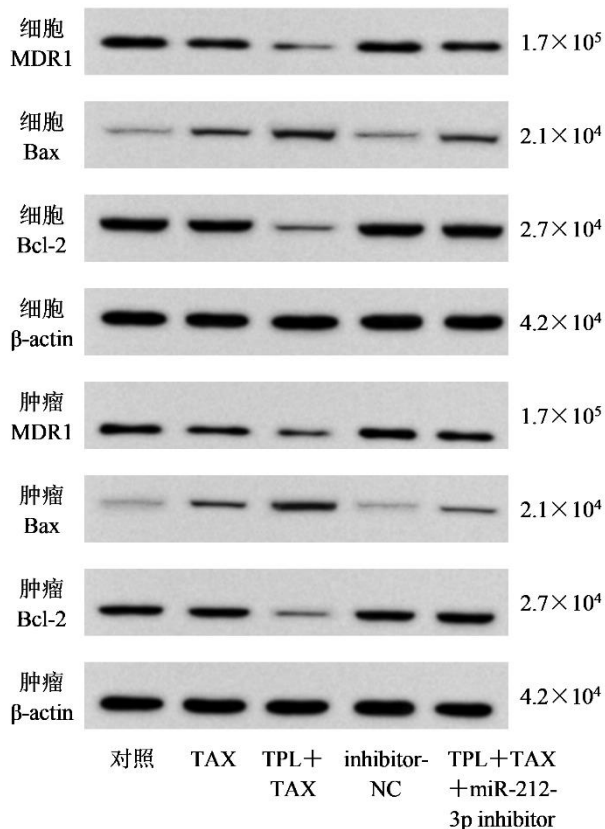


图 5 Western blotting 检测各组 SKOV3/TAX 细胞及其移植瘤裸鼠肿瘤组织凋亡、耐药相关蛋白表达

Fig. 5 Western blotting detection of apoptosis and drug resistance related protein expression in SKOV3/TAX cells and their transplanted tumor tissues of nude mice in each group

4 讨论

临床上以肿瘤细胞减灭术为基础辅助化疗来治疗卵巢癌, TAX 作为一线化疗药在卵巢癌辅助化疗过程中扮演着重要角色, 但卵巢癌细胞极易产生 TAX 耐药, 进而导致治疗失败, 探索化疗耐药的抵抗方法与药物一直是卵巢癌临床治疗的热点和难点^[3, 17]。TPL 是广泛分布在雷公藤根、叶、花及果实中的一种天然抗癌物质, 可通过诱导细胞凋亡、自噬衰老、焦亡、铁死亡和坏死等过程发挥抗癌作用^[8], 研究显示 TPL 可通过降低耐药蛋白表达而克服非小细胞肺癌细胞的 TAX 耐药性^[18], 因而推测 TPL 可能对卵巢癌 TAX 耐药性也具有抑制作用。本研究结果显示, 以 TPL 处理 TAX 干预下 SKOV3/TAX 细胞, 可降低其耐药指数, 并降低其在 TAX 干预下细胞存活率、裸鼠肿瘤体积、Bcl-2 蛋白表达, 升高其在 TAX 干预下细胞凋亡率、Bax 蛋白表达, 表明 TPL 可恢复卵巢癌 TAX 耐药细胞对 TAX 的敏感性, 促使其在 TAX 干预下调亡并抑制其增殖、裸鼠体内生长, 明显减轻卵巢癌细胞的 TAX 耐药性。

miR-212-3p 是重要的肿瘤调控因子, 在包括卵巢癌在内的妇科肿瘤中表达降低, 升高其表达水平可降低高级别浆液性卵巢癌和子宫内膜癌细胞侵袭、迁移和增殖活力^[4, 19], miR-212-3p 还可通过调控外排转运蛋白表达而介导癌症耐药性的产生过程^[20], 研究显示过表达 miR-212-3p 可减弱子宫内膜癌细胞的 TAX 耐药性^[5]; ZEB2 是一种上皮间充质转化诱导蛋白, 在肿瘤发生、转移与耐药性产生过程中起到关键调控作用, 抑制其表达可延缓卵巢癌细胞的增殖及迁移^[21], ZEB2 在结直肠癌细胞 5-氟尿嘧啶耐药产生过程中发挥诱导促进作用^[22], 且 Yang 等^[6]的研究表明 miR-212-3p 可通过直接靶向下调肝细胞癌细胞中的 ZEB2 表达而减弱其 TAX 耐药性。本研究结果显示, 相比 SKOV3 细胞, 其 TAX 耐药细胞 SKOV3/TAX 组 miR-212-3p 表达降低且 ZEB2 mRNA 表达升高, 表明 miR-212-3p/ZEB2 参与介导卵巢癌 TAX 耐药产生过程; 以 TPL 处理 SKOV3/TAX 细胞, 可升高 miR-212-3p 表达并降低其 ZEB2 表达, 表明 miR-212-3p/ZEB2 参与介导 TPL 对卵巢癌 TAX 耐药性的抑制过程。已有研究表明 TPL 在对癌细胞化疗耐药性的抑制作用具有多靶点、多信号特性, TPL 可通过抑制核因子-相关因子 2 (Nrf2) 表达增强白血病细胞对阿霉素的敏

感性^[10], 能通过诱导活性氧 (ROS) 产生以及抑制 JAK2/STAT3 信号通路降低宫颈癌细胞的顺铂耐药性^[12], TPL 还可通过阻碍 HNF1A/SHH 信号传导来克服非小细胞肺癌的 TAX 耐药^[18], 而本研究结果表明, 以 TPL 处理 TAX 干预下 SKOV3/TAX 细胞的同时降低 miR-212-3p 的表达, 可减弱 TPL 单独处理对 TAX 干预下 SKOV3/TAX 细胞的抗增殖与促凋亡作用, 逆转其对 SKOV3/TAX 细胞耐药性的减轻作用, 提示 TPL 减弱 SKOV3/TAX 细胞耐药性是通过上调 miR-212-3p 表达实现的。

TPL 可减轻人卵巢癌细胞的 TAX 耐药性, 抑制人卵巢癌 TAX 耐药细胞增殖、促进其凋亡, 阻碍人卵巢癌 TAX 耐药细胞在裸鼠体内肿瘤生长, 上调 miR-212-3p 而降低 ZEB2 表达可能是其发挥上述药理作用的机制, 本研究证实了 TPL 对人卵巢癌细胞耐药的抵抗功效, 对于卵巢癌临床化疗治疗效果的提升可发挥一定积极作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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] Ben-Arye E, Lavie O, Heyl W, et al. Integrative medicine for ovarian cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2023, 25(6): 559-568.
- [3] Mansoor M, Shakil F, Jalal U, et al. Comparison of the efficacy of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel in improving survival and quality of life in the advanced ovarian cancer patient population: A systematic review and meta-analysis of randomized control trials [J]. Cureus, 2023, 15(12): e51011.
- [4] Zhang L, Zhang Y, Wang S S, et al. miR-212-3p suppresses high-grade serous ovarian cancer progression by directly targeting MAP3K3 [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(3): 875-888.
- [5] 耿熙雪, 钱红霞, 韩燕, 等. CircWHSC1 调节 miR-212-3p/CD47 轴对子宫内膜癌细胞免疫逃逸和紫杉醇耐药性的影响 [J]. 现代妇产科进展, 2023, 32(7): 510-515.
Geng X X, Qian H X, Han Y, et al. Impacts of Circ WHSC1 on the immune escape and paclitaxel resistance of endometrial cancer cells by regulating the miR-212-3p/CD47 axis [J]. Prog Obstet Gynecol, 2023, 32(7): 510-515.
- [6] Yang J Y, Cui R H, Liu Y K. microRNA-212-3p inhibits paclitaxel resistance through regulating epithelial-

- mesenchymal transition, migration and invasion by targeting ZEB2 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(4): 23.
- [7] Cao J, Wang H, Yang J, et al. Exosome-transmitted miR-30a-5p enhances cell proliferation, migration, and invasion in ovarian cancer [J]. *Cell Div*, 2023, 18(1): 20.
- [8] AbdulHussein A H, Al-Tae M M, Radih Z A, et al. Mechanisms of cancer cell death induction by triptolide [J]. *Biofactors*, 2023, 49(4): 718-735.
- [9] 刘鑫, 邱明亮, 胡晓凤, 等. 雷公藤甲素抗器官纤维化作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55(10): 3569-3578.
- Liu X, Qiu M L, Hu X F, et al. Advance in anti-organ fibrosis mechanism of triptolide [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(10): 3569-3578.
- [10] Wu X, Chen S Q, Huang K C, et al. Triptolide promotes ferroptosis by suppressing Nrf2 to overcome leukemia cell resistance to doxorubicin [J]. *Mol Med Rep*, 2023, 27(1): 17.
- [11] 刘喜红, 杜晓丹, 范孟杨, 等. miR-328-3p-Akt/mTOR 轴在雷公藤甲素抑制脑胶质瘤细胞生长中的作用及机制研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(6): 697-705.
- Liu X H, Du X D, Fan M Y, et al. Role and mechanism of miR-328-3p-Akt/mTOR axis in the inhibition of glioma cell growth by triptolide [J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2023, 31(6): 697-705.
- [12] 刘秀玲, 王茹娜, 符小春, 等. 基于 JAK2/STAT3 信号通路探讨雷公藤甲素诱导宫颈癌耐药细胞自噬性死亡的机制 [J]. *中国药理学杂志*, 2022, 57(24): 2099-2107.
- Liu X L, Wang R N, Fu X C, et al. Mechanism of triptolide-induced autophagic death of drug-resistant cervical cancer cells based on JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Chin Pharm J*, 2022, 57(24): 2099-2107.
- [13] 王青慧, 李波, 胡传翠, 等. 沉默或抑制 TAK1 表达能够通过 NF- κ B 信号通路改善卵巢癌细胞的紫杉醇耐药性 [J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(4): 576-582.
- Wang Q H, Li B, Hu C C, et al. Silencing or inhibiting TAK1 expression can improve paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through the NF- κ B signaling pathway [J]. *J Mod Oncol*, 2022, 30(4): 576-582.
- [14] 陈燕晶, 杨丽兰, 谭布珍, 等. 雷公藤内酯醇逆转卵巢肿瘤微环境的体内实验研究 [J]. *实用癌症杂志*, 2022, 37(9): 1393-1398.
- Chen Y J, Yang L L, Tan B Z, et al. Reversal of ovarian tumor microenvironment by triptolide in vivo [J]. *Pract J Cancer*, 2022, 37(9): 1393-1398.
- [15] 王佳, 李瑞, 张菲菲, 等. miR-127-3p 靶向 KIF3B 缓解卵巢癌对紫杉醇的耐药性 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2023, 40(9): 1187-1192, 1199.
- Wang J, Li R, Zhang F F, et al. miR-127-3p targets KIF3B to alleviate resistance paclitaxel in ovarian cancer [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2023, 40(9): 1187-1192, 1199.
- [16] 谷芳, 王淑珍. 微囊泡对人卵巢癌细胞耐药性传递作用的初步研究 [J]. *中国计划生育和妇产科*, 2021, 13(6): 66-69, 98.
- Gu F, Wang S Z. The role of microvesicles in drug resistance transmission of human ovarian cancer cells [J]. *Chin J Fam Plan Gynecotokology*, 2021, 13(6): 66-69, 98.
- [17] Gelissen J H, Adjei N N, McNamara B, et al. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in ovarian cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2023, 30(9): 5597-5609.
- [18] Li L B, Yang L X, Liu L, et al. Targeted inhibition of the HNF1A/SHH axis by triptolide overcomes paclitaxel resistance in non-small cell lung cancer [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, 45(5): 1060-1076.
- [19] Lei T X, He D J, Cao J, et al. CircWDR26 regulates endometrial carcinoma progression via miR-212-3p-mediated typing genes MSH2 [J]. *Eur J Med Res*, 2022, 27(1): 135.
- [20] Reustle A, Fisel P, Renner O, et al. Characterization of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(12): 3181-3193.
- [21] Wang L, Miao Y L, Wen J R, et al. Methyl vanillate for inhibiting the proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells via the ZEB2/Snail signaling pathway [J]. *Transl Cancer Res*, 2023, 12(4): 828-836.
- [22] Qiao X X, Shi H B, Xiao L. Serum exosomal hsa-circ-0004771 modulates the resistance of colorectal cancer to 5-fluorouracil via regulating miR-653/ZEB2 signaling pathway [J]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23(1): 243-258.