

## LncRNAs 调控卵巢癌细胞卡铂耐药的机制和功能研究

洪 旂<sup>1</sup>, 陈翠兰<sup>2</sup>, 尹富强<sup>2,3</sup>, 刘 夏<sup>1,4</sup>

(1. 广西医科大学基础医学院 转化医学研究中心“长寿与老年相关疾病”教育部重点实验室 神经科学研究所“广西脑科学研究”重点实验室 广西高校人体发育与疾病研究重点实验室, 南宁 530021; 2. 广西医科大学生命科学研究院, 南宁 530021; 3. 广西医科大学区域性高发肿瘤早期防治研究教育部重点实验室, 南宁 530021; 4. 广西医科大学再生医学与医用生物资源开发应用省部共建协同创新中心 广西再生医学重点实验室, 南宁 530021)

**摘要 目的:**基于表达谱芯片筛选卵巢癌卡铂耐药中的差异长链非编码RNA(lncRNAs)并进行功能富集分析,从整体上了解lncRNA响应卵巢癌铂类耐药的信号途径;筛选卡铂耐药调控关键lncRNAs并进行相关功能研究,初步探究分子机制。**方法:**表达谱芯片筛选两对卵巢癌卡铂耐药和敏感细胞(HeyA8-CBP/HeyA8及SKOV3-CBP/SKOV3)中差异表达lncRNAs;基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)对差异表达的lncRNAs进行功能注释和通路富集;实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)检测lncRNAs的表达,蛋白免疫印迹法(western blotting)检测蛋白表达。慢病毒转染构建lncRNA DAPK1-IT1过表达细胞,克隆形成实验检测细胞增殖能力,流式细胞术检测细胞周期变化。**结果:**通过表达谱芯片分析,筛选出在两株耐药细胞中稳定差异表达lncRNAs 161个,其中表达上调lncRNAs 107个,表达下调lncRNAs 54个。KEGG通路富集结果表明,差异表达的lncRNAs显著富集于p53信号通路、溶酶体、粘着斑等经典耐药途径以及PPAR免疫相关信号通路。基于表达谱芯片和RT-qPCR验证,筛选出在两株卡铂耐药细胞中表达均显著下调4倍以上的lncRNA DAPK1-IT1进行功能验证。在卡铂处理下,过表达lncRNA DAPK1-IT1的卵巢癌卡铂耐药细胞SKOV3-CBP的克隆形成能力显著降低,并导致细胞周期阻滞于G<sub>2</sub>/M期;western blotting结果表明,lncRNA DAPK1-IT1显著影响细胞周期和细胞自噬相关蛋白的表达。**结论:**lncRNA DAPK1-IT1在卵巢癌卡铂耐药细胞中的表达稳定下调,其表达抑制卡铂耐药细胞克隆形成,阻滞细胞周期,影响细胞自噬,是卵巢癌卡铂耐药调控的潜在关键因子,而p53信号通路、溶酶体、PPAR信号通路和IL-18可能是lncRNAs调控卡铂耐药的潜在途径,研究结果为进一步理解卵巢癌耐药调控提供了新的思路。

**关键词** 卵巢癌;卡铂耐药;长链非编码RNA DAPK1-IT1

中图分类号:R737.31 文献标志码:A 文章编号:1005-930X(2025)01-0074-13

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.01.010

### Study on the mechanisms and functions of lncRNAs in regulating carboplatin resistance in ovarian cancer cells

HONG Yi<sup>1</sup>, CHEN Cuilan<sup>2</sup>, YIN Fuqiang<sup>2,3</sup>, LIU Xia<sup>1,4</sup>. (1. Key Laboratory of Longevity and Aging-Related Disease of Chinese Ministry of Education, Center for Translational Medicine, School of Basic Medical Sciences, Institute of Neuroscience and Guangxi Key Laboratory of Brain Science, Key Laboratory of Human Development and Disease Research, Education Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Life Sciences Institute, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. Key Laboratory of Early Prevention and Treatment for Regional High Frequency Tumour, Ministry of Education, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 4. Collaborative Innovation Centre of Regenerative Medicine and Medical BioResource Development and Application Co-constructed by the Province and Ministry, Guangxi Key Laboratory of Regenerative Medicine, Nanning 530021, China)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No.82260721;No.81903644);广西自然科学基金重点项目(No.2024GXNSFDA010045);广西医科大学高水平创新团队及杏湖学者计划项目(No.24/02304001018X)

[共同第一作者] 洪旂、陈翠兰

[通信作者] 刘夏, E-mail: reallixia@sina.com

[收稿日期] 2024-10-16

**Abstract Objective:** To screen for differentially expressed long non-coding RNAs (lncRNAs) in carboplatin-resistant ovarian cancer (OC) based on expression profiling microarrays and conduct functional enrichment analysis to comprehensively understand the signaling pathways of lncRNAs in response to carboplatin resistance in OC. Additionally, to screen for key lncRNAs regulating carboplatin resistance and explore their molecular mechanisms through functional studies. **Methods:** Differentially expressed lncRNAs were screened using expression profiling microarrays in two pairs of carboplatin-resistant and sensitive OC cells (HeyA8-CBP/HeyA8 and SKOV3-CBP/SKOV3). Functional annotation and pathway enrichment of differentially expressed lncRNAs were performed using Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect lncRNA expression, and western blotting was employed to assess protein expression. Lentiviral transfection was utilized to construct lncRNA DAPK1-IT1 over-expressing cells, colony formation assays were conducted to examine cell proliferation, and flow cytometry was used to analyze cell cycle changes. **Results:** Through expression profiling microarray analysis, 161 stably differentially expressed lncRNAs were identified in two resistant cell lines, including 107 up-regulated and 54 down-regulated lncRNAs. KEGG pathway enrichment revealed that the differentially expressed lncRNAs were significantly enriched in classical drug resistance pathways such as the p53 signaling pathway, lysosome, focal adhesion, and immune-related signaling pathways like PPAR. Based on expression profiling microarrays and RT-qPCR validation, lncRNA DAPK1-IT1, which was significantly down-regulated by more than 4-fold in both two carboplatin-resistant cell lines, was selected for functional verification. The results showed that under carboplatin treatment, the colony-forming ability of the carboplatin-resistant OC cells SKOV3-CBP over-expressing lncRNA DAPK1-IT1 was significantly reduced and caused cell cycle arrest at the G<sub>2</sub>/M phase. Results of western blotting indicated that lncRNA DAPK1-IT1 significantly affected the expression of cell cycle and autophagy-related proteins. **Conclusion:** The expression of lncRNA DAPK1-IT1 is stably down-regulated in carboplatin-resistant OC cells. Its expression inhibits colony formation, arrests cell cycle, and affects cell autophagy. It is a potentially key factor in regulating carboplatin resistance in OC. The p53 signaling pathway, lysosome, PPAR signaling pathway and IL-18 may be the potential pathways for lncRNAs' regulation of carboplatin resistance. These research findings provide new insights for a deeper understanding of the regulation of drug resistance in OC.

**Keywords** ovarian cancer; carboplatin resistance; lncRNA DAPK1-IT1

卵巢癌是常见的恶性妇科肿瘤,发病率位居全球第三,死亡率最高<sup>[1]</sup>。目前,铂类药物(如卡铂、顺铂)联合紫杉醇或多西他赛是卵巢癌术后化疗的标准治疗方案<sup>[2-4]</sup>,初期可显著改善患者预后。然而,大多数患者会随着化疗周期延长而出现耐药,导致预后不良<sup>[5-7]</sup>。铂类耐药的机制复杂,涉及DNA损伤修复、细胞周期调控、多药耐药等多种途径<sup>[8-12]</sup>。目前已有一些耐药机制的研究,但尚无有效方法克服铂类耐药,因此发现新的调控因素并阐明其机制至关重要。

非编码RNA(noncoding RNA, ncRNA)是人类基因组中不编码蛋白质的RNA,在调节恶性肿瘤生理和病理过程中起着重要作用。其中,长链非编码RNA(long- noncoding RNAs, lncRNAs)通过多种方式调控基因表达,并且在肿瘤的诊断和预后中具有

重要意义<sup>[13-15]</sup>。多个lncRNAs如lncRNA HCG18<sup>[16]</sup>、LINC01296<sup>[17]</sup>、lncRNA FAL1<sup>[18]</sup>、lncRNA KCNQ1OT1<sup>[19]</sup>、lncRNA PVT1<sup>[20]</sup>、lncRNA SNHG10<sup>[21]</sup>已被发现在卵巢癌耐药细胞或组织中异常表达,可能参与耐药调控。尽管现有研究揭示了多种lncRNAs在卵巢癌铂类耐药中的潜在作用机制,但其具体调控网络仍不清晰,需深入研究。

本研究通过表达谱芯片筛选卵巢癌卡铂耐药相关的差异表达lncRNAs,系统研究其潜在机制。通过实时荧光定量PCR(RT-qPCR)筛选关键lncRNA DAPK1-IT1,利用慢病毒转染构建过表达细胞,评估其对细胞增殖和细胞周期的影响,并用蛋白质免疫印迹(western blotting)验证相关蛋白的变化,以期为卵巢癌耐药治疗提供新靶点和策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株** 人卵巢癌亲本细胞 HeyA8(缩写为H)、SKOV3(缩写为S)为本课题组保存。卵巢癌卡铂耐药细胞 HeyA8-CBP(H-C)和 SKOV3-CBP(S-C)为一定浓度的卡铂诱导其亲本细胞培养10个月以上形成的耐药细胞株<sup>[22-23]</sup>。

**1.1.2 主要试剂** RIMP 1640 培养基(货号:350-006-CL)购自维森特生物技术(南京)有限公司;胎牛血清(货号:10099141C)、青链霉素混合液( $\times 100$ )(货号:15140122)、胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.05%)(货号:25300120)、TRIzol 试剂(货号:15596026)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号:23227)、ECL 超敏发光液(货号:34580)购自赛默飞世尔科技公司;PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(货号:RR047A)、荧光定量PCR 扩增试剂盒(货号:Q711-02/03)购自宝日医生物技术(北京)有限公司;嘌呤霉素(货号:P8230)、结晶紫染色液(0.1%)(货号:G1063)、4%组织细胞固定液(货号:P1110)购自北京索莱宝科技有限公司;鞘液 Dx FLEX sheath Fluid(货号:B73613)购自贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司;10 $\times$ Tris 甘氨酸电泳缓冲液(货号:C520001-0500)、4 $\times$ Tris-HCl 浓缩胶缓冲液(pH=6.8)(货号:C506034-0250)、4 $\times$ Tris-HCl 分离胶缓冲液(pH=8.8)(货号:C506033-0250)、丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 40% 溶液(货号:B546013-0500)、10 $\times$ Tris 转膜印迹缓冲液(货号:C520003-0500)、10 $\times$ TBST(货号:C520009-0500)、Ture Color 双色预染 Marker(货号:C520009-0500)、RealBand 蛋白预染 Marker(货号:C620014-0250)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;细胞周期试剂盒(货号:70-CCS012)购自杭州联科生物技术股份有限公司;p18 INK4C、GSK-3 $\beta$ 、p21、LCBA/B、Beclin-1、ULK1、p62、GAPDH 购自 Cell Signaling Technology 公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 lncRNA 芯片及生物信息学分析** 采用 SBC-lncRNA (4 $\times$ 180k) 芯片(上海伯豪生物技术有限公司)进行 H-C 和 S-C 及 H 和 S 差异表达的 lncRNAs 的筛选,并通过基因本体注释(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集等生物信息学方法研究差异 lncRNAs 调控耐药的机制。

**1.2.2 细胞培养** 培养细胞所用的 RIMP 1640 培养

基包含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素。细胞避光孵育于 37  $^{\circ}$ C、含有 5% CO<sub>2</sub> 的恒温细胞培养箱中。

**1.2.3 细胞慢病毒转染** lncRNA DAPK1-IT1 空载病毒(empty vector, EV)和过表达病毒(over expression, OE)由赛业(广州)生物科技有限公司合成。分别对 H-C 及 S-C 进行转染。待荧光稳定表达后,扩大转染,并用 1  $\mu$ g/mL 的嘌呤霉素筛选稳定转染的细胞。两对过表达 lncRNA DAPK1-IT 及空载的卵巢癌卡铂耐药细胞分别命名为 H-C-OE、H-C-EV 及 S-C-OE、S-C-EV。RT-qPCR 用于验证过表达效率。

**1.2.4 RT-qPCR** 采用 TRIzol 法裂解细胞,提取总 RNA。将总 RNA 逆转为 cDNA,进行 PCR 扩增。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法计算目的基因相对表达量。实验进行 3 次生物学重复,每次重复设置 3 个复孔。引物名称及序列见表 1。

**1.2.5 克隆形成** 将细胞以 200 个/孔接种于 6 孔板中。用 7.812 5  $\mu$ mol/L 和 15.625  $\mu$ mol/L 卡铂处理细胞,培养期间适当更换培养基。于第 11 天时取出培养皿,用 1 mL 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min,0.02% 的结晶紫染色。双蒸水将结晶紫染液清洗干净,晾干后进行扫描读数。实验进行 3 次生物学重复,通过 Image J 软件计算克隆数和克隆面积。

**1.2.6 细胞周期** 将细胞接种于 6 cm 的培养皿中,按照细胞周期试剂盒说明书进行操作。0  $\mu$ mol/L、62.5  $\mu$ mol/L、93.75  $\mu$ mol/L、125  $\mu$ mol/L 和 187.5  $\mu$ mol/L 卡铂处理 S-C-EV 和 S-C-OE 细胞 72 h 后,用流式细胞术对细胞周期进行检测。采用 Modfit 对细胞周期的结果进行分析。实验进行 3 次生物学重复。

**1.2.7 western blotting** 按照蛋白分子量大小,制备 7%、12%、15% 的分离胶以及 5% 的浓缩胶。电泳结束后用湿转法将蛋白转至 PVDF 膜中,用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。4  $^{\circ}$ C 孵育一抗 16~18 h(GSK-3 $\beta$ 、p21、LCBA/B、Beclin-1、ULK1、p62 的稀释比例均为 1:1 000;p18 INK4C 的稀释比例为 1:3 000),清洗后,孵育二抗 1 h(GAPDH 稀释比例为 1:12 000)。再次清洗后用 ECL 超敏发光液对蛋白条带进行显影处理。

**1.2.8 统计学方法** 本实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,采用两独立样本 *t* 检验进行组间比较,分析 RT-qPCR 和细胞周期的结果;用 LSD-*t* 检验分析克隆形成结果,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表1 PCR引物序列

| 基因                  | 引物序列                                                                   |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <i>GAPDH</i>        | 上游:5'-CAGCCTCAAGATCATCAGCAAT-3'<br>下游:5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3'     |
| lncRNA AKR1C3       | 上游:5'-CCAGGGTTCACCTCAGCACA-3'<br>下游:5'-CCAGAAGCAATGGTTGGCAG-3'         |
| lncRNA APDDCL       | 上游:5'-AGTGACCACTTCGCTGTCTG-3'<br>下游:5'-CTGTTTGTGCTGGGGCTTTAT-3'        |
| lncRNA CTD-3023L14  | 上游:5'-ATCAGAAAGTGGAAGGTGGGT-3'<br>下游:5'-CATTTGGTCAGGACAGCAGAG-3'       |
| lncRNA FOXL1        | 上游:5'-CCCTGCGCTTGCTATTTGAC-3'<br>下游:5'-TTGTCACCCAGTGAGAGGGA-3'         |
| <i>LINC01605</i>    | 上游:5'-GTCCCTCCCTTCCTGCCACT-3'<br>下游:5'-AGAAACAACCGCACCCACCA-3'         |
| <i>LOC100131347</i> | 上游:5'-CTCTGAGTCCAGATGGGATGA-3'<br>下游:5'-GGGGCTGTAGTGAAGTGTGAT-3'       |
| <i>LOC100507412</i> | 上游:5'-TGTGATGTCGAAGCTGAAGTG-3'<br>下游:5'-GAGGTGTTTGCCGTGGTTT-3'         |
| lncRNA MKLN1        | 上游:5'-GAGTAAGTCAGCAGGATTCACAG-3'<br>下游:5'-GGGGACCAGACCCTCGTAT-3'       |
| lncRNA KIF26B       | 上游:5'-TGCCATCTCTTGGCTCTT-3'<br>下游:5'-CAGGTTCTCCTCCTTCCC-3'             |
| lncRNA DAPK1-IT1    | 上游:5'-GGGAAACTCTGCTGTCAACTAA-3'<br>下游:5'-AAATGCTGCTCGTGATGTATG-3'      |
| lncRNA NR003021     | 上游:5'-CCTGTTGCCTTCAGACCTGG-3'<br>下游:5'-TTCCGCAAATTTAGAGAACAGA-3'       |
| lncRNA RP11-11N9    | 上游:5'-GGTGAATAAACTGACACTGGAACA-3'<br>下游:5'-CTGTATAACTTGGCATTCTGGTGA-3' |
| lncRNA RP11-445F    | 上游:5'-TGACTTTGAAGGGAAGGTTGC-3'<br>下游:5'-GGCTTGAGTGGAATGTGGG-3'         |
| lncRNA TRHDE        | 上游:5'-GACCTGGGTTTGCGGGTAGAG-3'<br>下游:5'-GAGTGGCGGTGGAGAAAGTGC-3'       |
| lncRNA XIST         | 上游:5'-GCCTTGGGGAACCACTACAC-3'<br>下游:5'-CTCCATTTTGCTATGCGTTATCTGA-3'    |

2 结 果

2.1 两株卵巢癌卡铂耐药细胞中差异 lncRNAs 筛选及功能分析

2.1.1 卵巢癌卡铂耐药和敏感细胞中差异表达 lncRNAs 通过表达谱芯片鉴定 H-C/H 和 S-C/S 中差

异表达 lncRNAs。H-C/H 细胞有 1 034 个表达上调和 774 个表达下调的 lncRNAs(图 1A~图 1C),而 S-C/S 细胞有 787 个表达上调和 644 个表达下调的 lncRNAs(图 1D~1F)。其中,在两株耐药细胞中表达均显著上调的 lncRNAs 107 个,均显著下调的 lncRNAs 54 个。H-C/H 和 S-C/S 中上调和下调最显著的前 30 个 lncRNAs 分别见表 2、表 3。



表2 H-C/H 中上调和下调表达倍数最显著的 30 个 lncRNAs

| 序列编号                | 差异倍数           | <i>P</i>      | 来源              | 类型     | 关联                 |
|---------------------|----------------|---------------|-----------------|--------|--------------------|
| 前 15 个表达上调的 lncRNAs |                |               |                 |        |                    |
| lnc-PDK1-1:3        | 287.065 640 70 | 0.000 193 776 | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |
| ENST00000617298     | 220.259 108 80 | 0.000 417 199 | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| NR_038958           | 130.426 463 50 | 3.365 64E-05  | RefSeq          | lncRNA | intergenic         |
| lnc-GTF3A-2:1       | 38.697 280 68  | 3.638 74E-06  | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |
| ENST00000613130     | 31.555 480 19  | 0.002 596 227 | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| ENST00000426166     | 28.419 604 64  | 0.000 136 128 | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| lnc-AKR1C2-4:8      | 27.464 767 69  | 0.008 377 442 | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |
| ENST00000624511     | 23.381 217 97  | 0.000 543 973 | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| NR_104173           | 22.866 205 82  | 0.000 186 171 | RefSeq          | lncRNA | intronic_antisense |
| NR_104172           | 22.783 267 01  | 0.001 101 844 | RefSeq          | lncRNA | intronic_antisense |
| ENST00000415590     | 22.648 545 81  | 5.737 36E-05  | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intronic_antisense |
| NR_033753           | 22.284 786 84  | 3.591 96E-05  | RefSeq          | lncRNA | intergenic         |
| NR_027082           | 21.895 890 25  | 6.420 47E-05  | RefSeq          | lncRNA | intronic_antisense |
| lnc-COL4A1-2:8      | 21.878 791 82  | 0.000 726 516 | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |
| lnc-TSPY10-13:1     | 19.721 987 97  | 0.000 735 472 | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |
| 前 15 个表达下调的 lncRNAs |                |               |                 |        |                    |
| NR_001564           | 0.001 996 906  | 0.002 078 499 | RefSeq          | lncRNA | intergenic         |
| lnc-HRK-2:1         | 0.011 862 816  | 5.850 63E-05  | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |
| ENST00000433732     | 0.020 219 510  | 1.852 42E-06  | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| lnc-ZNF570-2:1      | 0.029 665 015  | 0.000 201 975 | Incipedia       | lncRNA | exonic_sense       |
| lnc-EYA2-5:1        | 0.030 851 116  | 0.000 122 974 | Incipedia       | lncRNA | exonic_sense       |
| lnc-SMARCAL1-3:2    | 0.032 144 059  | 2.520 08E-05  | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |
| NR_003255           | 0.032 415 665  | 0.001 760 426 | RefSeq          | lncRNA | intergenic         |
| lnc-SNX29-3:1       | 0.032 603 040  | 0.005 017 444 | Incipedia       | lncRNA | exonic_sense       |
| lnc-LIN7A-3:1       | 0.037 640 071  | 0.001 381 975 | Incipedia       | lncRNA | exonic_sense       |
| lnc-SMARCAL1-3:2    | 0.038 469 903  | 0.000 130 602 | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |
| ENST00000602992     | 0.042 158 723  | 0.002 413 831 | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| NONHSAT029682       | 0.044 582 770  | 0.006 705 293 | NONCODE         | lncRNA | exonic_sense       |
| lnc-PCDH9-13:1      | 0.046 787 243  | 0.000 169 008 | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |
| lnc-VN1R4-3:1       | 0.048 773 018  | 4.019 91E-05  | Incipedia       | lncRNA | intronic_sense     |
| NR_037883           | 0.048 799 858  | 0.004 033 224 | RefSeq          | lncRNA | intergenic         |

表3 S-C/S 中上调和下调表达倍数最显著的 30 个 lncRNAs

| 序列编号                | 差异倍数          | <i>P</i>      | 来源              | 类型     | 关联                 |
|---------------------|---------------|---------------|-----------------|--------|--------------------|
| 前 15 个表达上调的 lncRNAs |               |               |                 |        |                    |
| NR_033914           | 73.129 537 95 | 0.009 347 378 | RefSeq          | lncRNA | intergenic         |
| lnc-SPTLC1-6:3      | 69.146 920 41 | 0.000 637 612 | Incipedia       | lncRNA | intronic_sense     |
| ENST00000422198     | 51.100 632 01 | 0.000 650 138 | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| ENST00000420058     | 47.615 170 68 | 0.003 859 286 | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | exonic_sense       |
| lnc-TGFBI-4:2       | 38.173 992 13 | 0.014 374 979 | Incipedia       | lncRNA | intronic_sense     |
| NR_015377           | 36.737 217 93 | 0.009 892 032 | RefSeq          | lncRNA | exonic_antisense   |
| lnc-HOOK1-6:1       | 34.933 952 71 | 0.008 511 384 | Incipedia       | lncRNA | intronic_sense     |
| lnc-UMODL1-4:5      | 26.104 372 79 | 1.496 93E-05  | Incipedia       | lncRNA | bidirectional      |
| NR_015377           | 23.469 426 49 | 0.000 401 804 | RefSeq          | lncRNA | exonic_antisense   |
| ENST00000444476     | 22.255 646 84 | 0.002 837 386 | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| ENST00000454712     | 21.015 755 45 | 0.012 707 050 | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | exonic_antisense   |
| ENST00000624132     | 20.528 684 35 | 0.000 200 340 | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| NR_015377           | 20.341 439 90 | 0.027 073 880 | RefSeq          | lncRNA | exonic_antisense   |
| ENST00000444476     | 20.125 119 63 | 0.007 589 730 | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| NR_120623           | 19.940 431 31 | 0.000 206 832 | RefSeq          | lncRNA | intronic_antisense |
| 前 15 个表达下调的 lncRNAs |               |               |                 |        |                    |
| NR_036685           | 0.001 503 634 | 0.000 125 264 | RefSeq          | lncRNA | intergenic         |
| NR_030171           | 0.001 831 339 | 7.282 75E-05  | RefSeq          | lncRNA | intergenic         |
| ENST00000390196     | 0.001 960 483 | 9.139 29E-05  | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| NR_001564           | 0.004 012 166 | 0.034 700 105 | RefSeq          | lncRNA | intergenic         |
| NONHSAT113817       | 0.004 484 244 | 0.000 242 322 | NONCODE         | lncRNA | intergenic         |
| lnc-PROCA1-1:4      | 0.004 626 096 | 0.000 326 631 | Incipedia       | lncRNA | exonic_sense       |
| ENST00000509399     | 0.005 792 482 | 1.678 98E-05  | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| lnc-CFI-3:1         | 0.005 888 990 | 0.000 465 821 | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |
| ENST00000390208     | 0.006 353 638 | 0.001 373 580 | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| lnc-RNF212-1:4      | 0.007 373 055 | 0.000 420 798 | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |
| lnc-TNFRSF13B-8:1   | 0.008 090 654 | 0.000 120 727 | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |
| lnc-CPT2-1:1        | 0.009 439 886 | 7.899 98E-05  | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |
| lnc-CALB1-1:2       | 0.011 177 058 | 0.010 377 844 | Incipedia       | lncRNA | exonic_sense       |
| ENST00000502427     | 0.011 258 752 | 0.000 107 704 | ENSEMBL_GENCODE | lncRNA | intergenic         |
| lnc-FOLR3-2:2       | 0.011 310 045 | 4.497 07E-05  | Incipedia       | lncRNA | intergenic         |

**2.1.2 GO 功能注释和 KEGG 通路富集** 顺式和反式调控是 lncRNAs 调控靶基因的最主要方式。因此,基于 lncRNAs 顺式和反式调控的潜在靶基因进行 GO 和 KEGG 通路富集,从而从整体上了解 lncRNAs 调控铂类耐药的分子机制。通过 GO 对 H-C/

H 及 S-C/S 中均差异表达 lncRNAs 进行注释,最显著的 30 个条目见图 1G~1J 所示。其中,在 H-C/H 及 S-C/S 中的注释到的顺式作用共性条目共 2 个(图 1G 和图 1H),反式作用共性条目共 6 个(图 1I 和图 1J); 共性 GO 条目包括聚酮化合物的代谢过程

(poly- ketide metabolic process)、醇脱氢酶活性(alcohol dehydrogenase (NADP+) activity)、鞘氨醇代谢过程(sphingosine metabolic process)、钾离子结合(potassium ion binding)、有丝分裂中心体分离(mitotic centrosome separation)、白介素-18产生(interleukin-18 production)和中心粒—中心粒粘合(centriole-centriole cohesion)等。同理,差异表达 lncRNAs 调控的靶基因通过 KEGG 通路富集得到顺式调控共性通路 5 条(图 1K 和图 1L),反式作用共性通路 8 条(图 1M 和图 1N);共性通路包括 p53 信号通路、PPAR 信号通路(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)、溶酶体(lysosome)和粘着斑(focal adhesion)等通路。

## 2.2 RT-qPCR 验证两株铂类耐药细胞中共性差异表达 lncRNAs

将 H-C 与 H 和 S-C 与 S 中上调和下调的 lncRNAs 进行重叠分析,一共得到 161 个共性差异表达 lncRNAs,其中在 H-C 和 S-C 中均稳定上调的 lncRNAs 有 107 个,均稳定下调的 lncRNAs 有 54 个(图 1O 和图 1P)。通过 RT-qPCR 对其中差异表达 4 倍以上的 lncRNAs 进行表达验证,包括 9 个上调表达的 lncRNAs (*FOXLI*、*LINC01605*、*LOC100507412*、*APCDDL*、*MKLN1*、*LOC100131347*、*KIF26B*、*CTD-3023L14* 和 *AKRIC3*) 和 6 个下调表达的 lncRNAs (*DAPK1-IT1*、*RP11-IIN9*、*RP11-445F*、*TRHDE*、*NR003021* 和 *XIST*)(图 2)。验证的 15 个 lncRNAs,全部在 H-C 和 S-C 中差异表达,其中 lncRNA *FOXLI*、*LINC01605* 等在两株耐药细胞中的表达均稳定上调,lncRNA *DAPK1-IT1*、*RP11-IIN9*、*RP11-*

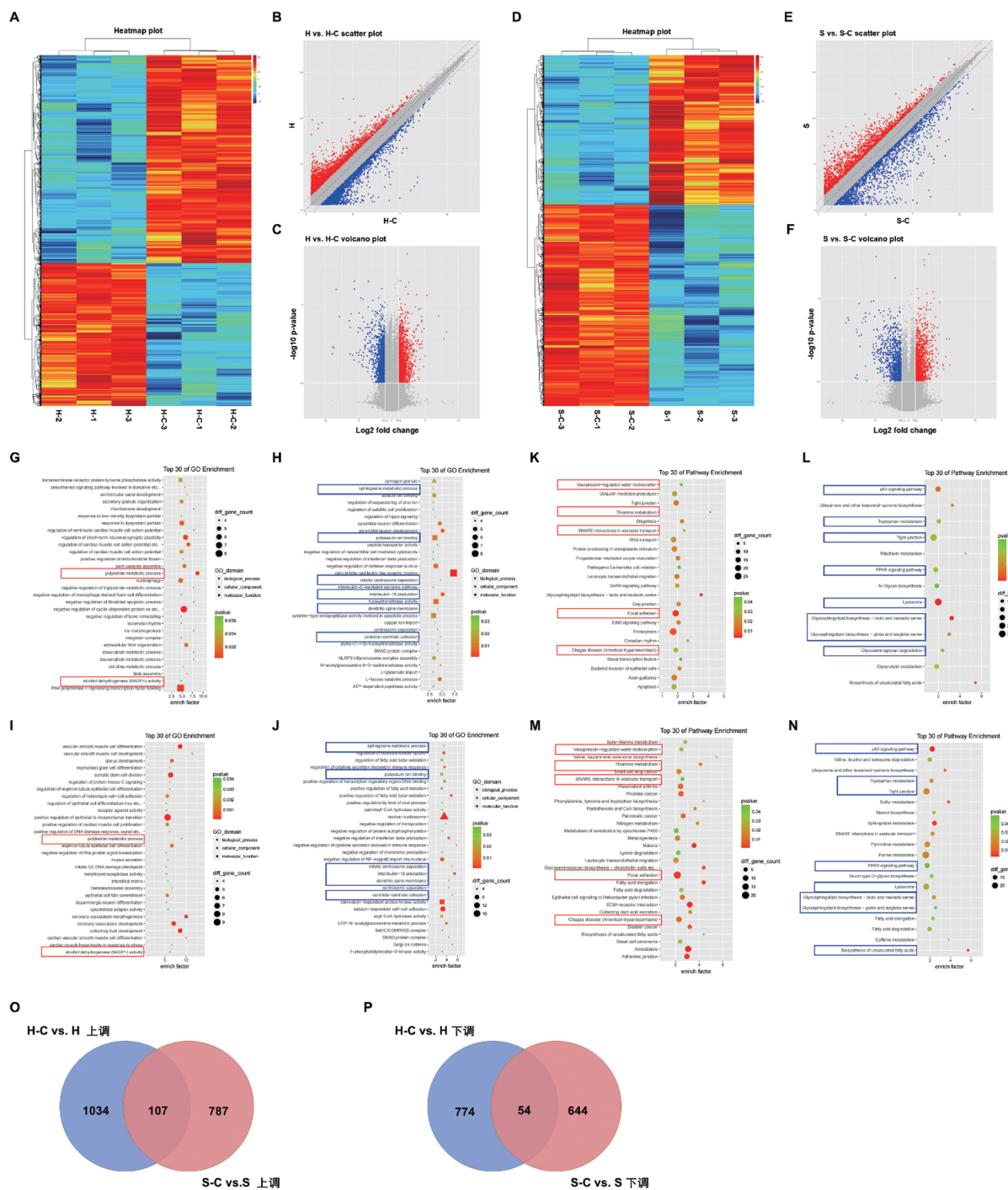
*445F*、*TRHDE* 和 *XIST* 在两株耐药细胞中的表达均稳定下调,和芯片结果一致。

## 2.3 lncRNA *DAPK1-IT1* 对卵巢癌卡铂耐药细胞的影响

**2.3.1** 过表达 lncRNA *DAPK1-IT1* 抑制卡铂耐药细胞克隆形成 基于上述芯片结果和 RT-qPCR 验证结果,结合以往研究,筛选出在两株耐药细胞中表达显著下调 4 倍以上,且与卵巢癌相关研究鲜见的 *DAPK1-IT1* 进行后续研究。通过慢病毒转染 S-C 细胞构建 lncRNA *DAPK1-IT1* 稳定过表达细胞 S-C-OE(图 3),克隆形成实验结果显示,在卡铂处理条件下,和空载细胞 S-C-EV 相比,lncRNA *DAPK1-IT1* 过表达细胞 S-C-OE 的克隆数和克隆面积显著减少(图 4),克隆形成能力明显减弱。

**2.3.2** 过表达 lncRNA *DAPK1-IT1* 阻滞卡铂耐药细胞周期 流式细胞术的结果显示,卡铂处理 72 h 后,与 S-C-EV 相比,S-C-OE 的细胞周期被显著阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期(图 5)。

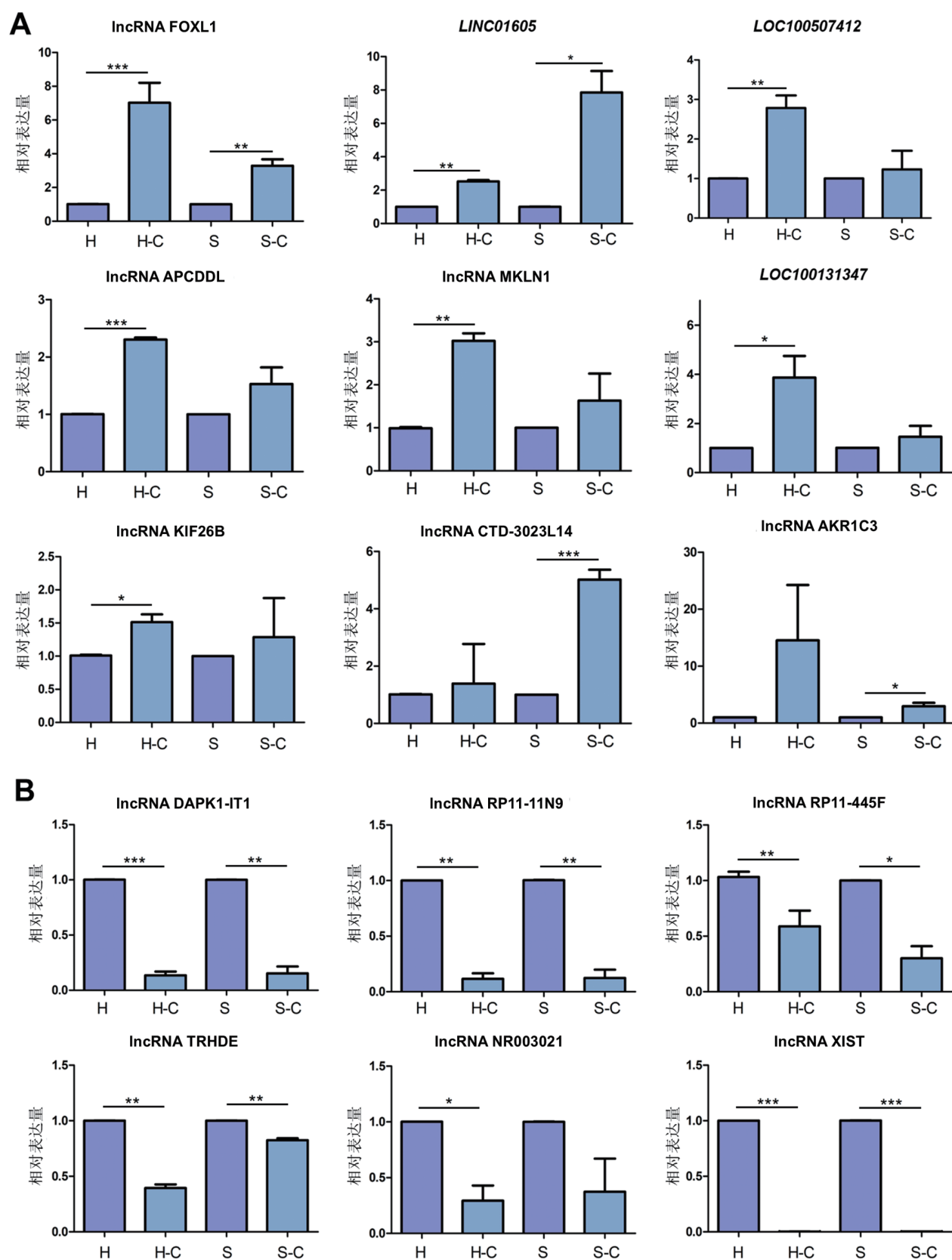
**2.3.3** 过表达 lncRNA *DAPK1-IT1* 影响卡铂耐药细胞的细胞周期及细胞自噬相关蛋白的表达 Western blotting 检测细胞周期相关蛋白的表达,见图 6。相比于 S-C-EV 细胞,S-C-OE 细胞中 p18 INK4C、GSK-3 $\beta$  表达水平增加,p21 表达水平下降。本研究继续通过 western blotting 检测 S-C-EV 和 S-C-OE 在卡铂处理下细胞自噬相关蛋白的表达情况。与 S-C-EV 组相比,相同卡铂浓度下的 S-C-OE 中,LC3A/B 蛋白表达增加,Becn-1 和 ULK1 表达下降,而 p62 没有明显变化。



A: H-C/H中差异表达的lncRNAs的热图; B: 散点图; C: 火山图; D: S-C/S中差异表达的lncRNAs的热图; E: 散点图; F: 火山图; G, H: H-C/H中差异lncRNAs分别通过顺式作用和反式作用调控的靶基因通过GO注释得到的前30个条目; I, J: S-C/S中差异lncRNAs分别通过顺式作用和反式作用调控的靶基因通过GO注释得到的前30个条目(红色框为在H-C/H及S-C/S中通过GO注释得到的顺式作用共性条目; 蓝色框为在H-C/H及S-C/S中通过GO注释得到的反式作用共性条目); K, L: H-C/H中差异lncRNA分别通过顺式作用和反式作用调控的靶基因通过KEGG通路富集得到的前30条信号通路; M, N: S-C/S中差异lncRNAs分别通过顺式作用和反式作用调控的靶基因通过KEGG通路富集得到的前30条信号通路(红色框为在H-C/H及S-C/S中通过KEGG通路富集得到的顺式作用共性通路; 蓝色框为在H-C/H及S-C/S中通过KEGG通路富集得到的反式作用共性通路); O: 上调表达的lncRNAs的韦恩图; P: 下调表达的lncRNAs的韦恩图。

图1 两株卡铂耐药细胞和亲本细胞H-C/H及S-C/S中差异lncRNAs的整体分布及分析





A: 两株耐药细胞中表达上调的9个lncRNAs表达验证; B: 两株耐药细胞中表达下调的6个lncRNAs的表达验证; 组间比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图2 RT-qPCR验证H-C/H及S-C/S中差异lncRNAs的相对表达水平

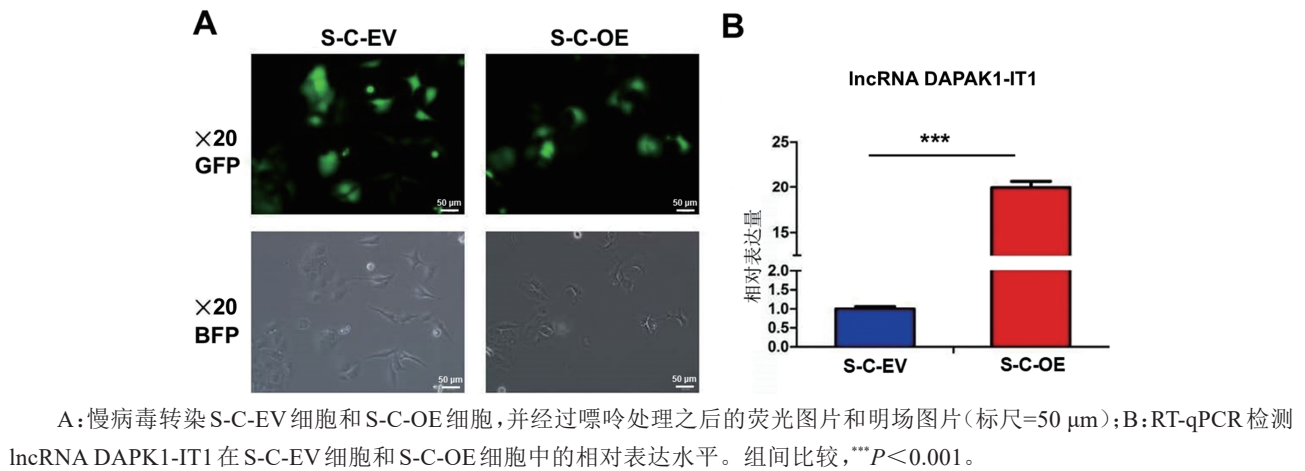


图3 过表达lncRNA DAPK1-IT1的卵巢癌卡铂耐药细胞的构建以及验证

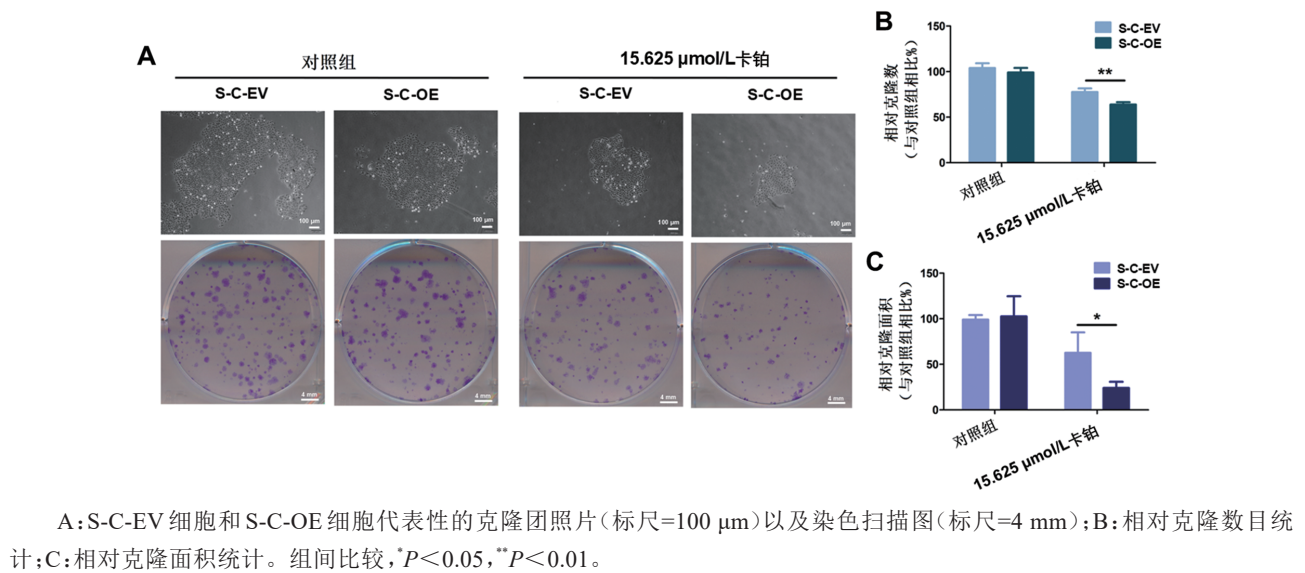


图4 过表达lncRNA DAPK1-IT1对卵巢癌卡铂耐药细胞在卡铂处理下的克隆形成能力的影响

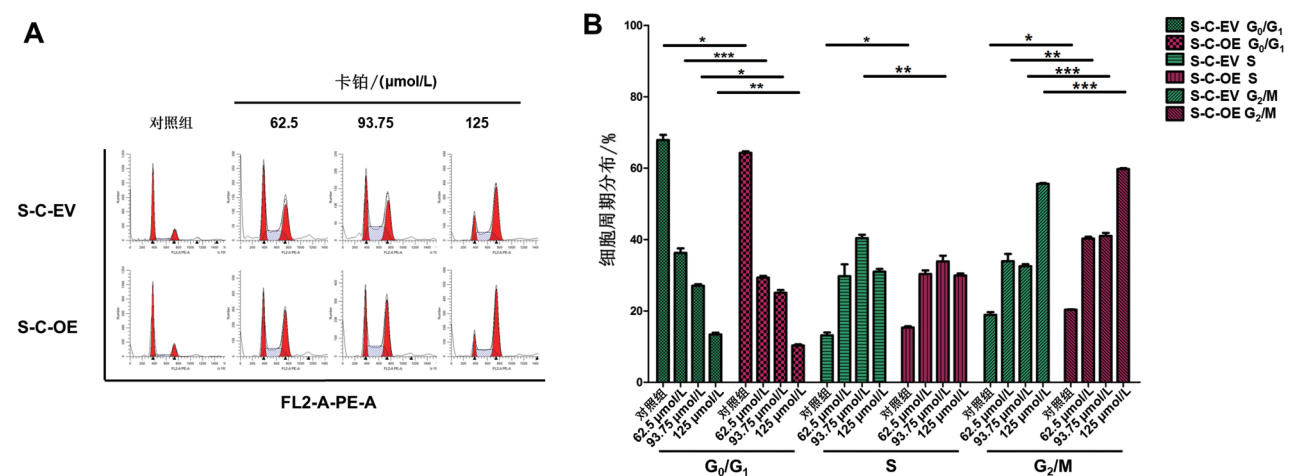


图5 过表达lncRNA DAPK1-IT1对卵巢癌卡铂耐药细胞在卡铂处理下的细胞周期的影响

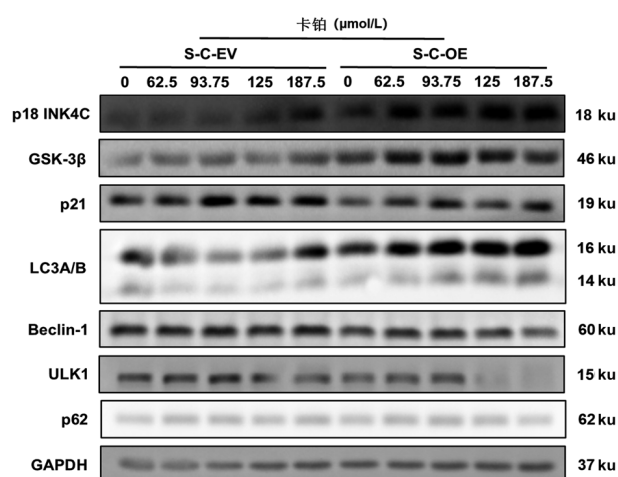


图6 过表达 lncRNA DAPK1-IT1 对卵巢癌 SKOV3 卡铂耐药细胞在卡铂处理下细胞周期相关蛋白及细胞自噬相关蛋白表达水平的影响

### 3 讨论

卵巢癌是女性生殖系统中致死率较高的妇科肿瘤之一,由于其发病隐匿,早期无明显症状,往往在晚期才能被诊断出来。目前治疗手段以手术切除联合化疗为主,但长期使用铂类和紫杉醇易导致耐药,影响治疗效果和生存率<sup>[24]</sup>。因此,研究铂类耐药的分子机制并筛选相关调控分子,对提高卵巢癌患者生存率具有重要意义。

lncRNAs 能够通过直接或间接作用于靶基因,调节组蛋白修饰和染色质重塑等表观遗传事件、以及作为内源竞争性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA),进而通过调控药物外排、DNA 损伤修复、细胞凋亡及诱导药物靶标突变等过程调节肿瘤耐药<sup>[15]</sup>。越来越多 lncRNAs 被发现参与化疗耐药,但目前只有少数 lncRNAs 的卵巢癌铂类耐药的分子机制得到阐明。例如, lncRNA HOTAIR 作为 miR-373、miR-206 的 ceRNA 通过调控 NF-κB、PI3K/AKT/mTOR、β-Wnt/catenin、自噬等通路参与卵巢癌发生、发展及耐药<sup>[25]</sup>。敲除 lncRNA MALAT1 可通过 Notch1、PI3K/AKT、Bcl-2/Caspase-3 等信号通路调控卵巢癌细胞对铂类药物的敏感性<sup>[26]</sup>。现有研究多集中于个别 lncRNAs 的研究,大多缺乏对整体调控网络的系统性探索。基于此,本研究基于两株卵巢癌耐药细胞的表达谱芯片分析,揭示了与卵巢癌铂类耐药调控相关的信号通路,筛选出与铂类耐药调控相关的 lncRNAs,并就关键 lncRNAs 的功能进

行初步探讨,研究结果为进一步理解卵巢癌耐药的调控机制提供了理论依据。

首先,本研究基于 KEGG 通路富集分析,在两株耐药细胞中鉴定出了 13 条 lncRNAs 调控卵巢癌铂类耐药的潜在信号通路,包括 p53 信号通路、溶酶体(lysosome)、粘着斑(focal adhesion)等。p53 信号通路的失调或突变是许多癌症化疗耐药的一个主要原因<sup>[27]</sup>,并且其改变通常与细胞增强的 DNA 修复能力和对铂类药物诱导的细胞死亡的抵抗密切相关<sup>[28]</sup>,在卵巢癌铂类耐药中发挥了重要作用。细胞周期作为 p53 信号通路的下游通路, p53 信号通路关键基因的异常表达会导致细胞周期阻滞<sup>[29]</sup>。而溶酶体通路的改变可以影响药物在细胞内的分布、降解和转运,进而调节肿瘤细胞对化疗药物的敏感性<sup>[30]</sup>。另一个值得注意的发现是免疫相关信号通路在卵巢癌耐药中的潜在作用,免疫细胞功能的失调可能导致肿瘤细胞逃逸免疫监视,进而促进耐药性的发生<sup>[31]</sup>。本研究发现, lncRNAs 可能通过免疫相关通路及条目如 PPAR 信号通路和白介素-18 条目参与卵巢癌铂类耐药的调控。

本研究重点探讨了 lncRNA DAPK1-IT1 在卵巢癌铂类耐药中的作用。DAPK1 属于死亡相关蛋白激酶(death-associated protein kinase, DAPK)家族中的一员,是一类抑癌基因,在许多肿瘤类型中表达下调,影响着肿瘤的发生、发展<sup>[32]</sup>。lncRNA DAPK1-IT1 作为 DAPK1 的内含子转录本,在胰腺癌组织<sup>[33]</sup>和多发性骨髓瘤中呈低表达<sup>[34]</sup>,参与调节肿瘤细胞生物学功能,并能够调节巨噬细胞的胆固醇代谢和炎症反应,促进动脉粥样硬化<sup>[35]</sup>。但总体上来说, lncRNA DAPK1-IT1 在肿瘤中的研究较少,与卵巢癌耐药相关研究更为少见。lncRNA DAPK1-IT1 在 S-C 和 H-C 中表达显著下调,其过表达能够显著抑制耐药细胞的克隆形成能力,阻滞细胞周期于 G<sub>2</sub>/M 期,并影响上调周期相关蛋白 p18 INK4C、GSK-3β,下调 p21 蛋白表达水平。同时能够上调自噬相关蛋白 LC3A/B、下调 Beclin-1 和 ULK1 的表达水平。提示 lncRNA DAPK1-IT1 可能通过调节细胞增殖、细胞周期及自噬等过程,参与调控卵巢癌铂类耐药。未来的研究可以进一步探讨 lncRNAs 与关键信号通路之间的相互作用,深入探究这些 lncRNAs 是如何参与调控卵巢癌的铂类耐药。同时, lncRNA

DAPK1-IT1通过阻滞细胞周期、影响细胞自噬和卵巢癌铂类耐药性的作用机制仍需进一步探究。

上述结果在一方面,基于两株耐药细胞差异表达lncRNAs的通路富集,发现p53和溶酶体等信号通路可能是lncRNAs参与铂类耐药调控的重要途径;另一方面,基于表达谱芯片和RT-qPCR筛选并验证的lncRNA DAPK1-IT1,其过表达能够阻滞细胞周期,并能改变细胞自噬关键蛋白的表达。上述两方面的结果互相支撑且理论上一致,并和以往研究结果一致。

综上,本研究基于铂类耐药细胞表达谱芯片,从整体上对lncRNAs调控卵巢癌铂类耐药的机制进行了探讨,发现了p53、溶酶体以及免疫相关信号通路,并初步筛选出了铂类耐药调控关键lncRNA DAPK1-IT1。研究结果为进一步深入理解卵巢癌铂类耐药机制提供了新的见解,也为卵巢癌治疗提供了潜在的靶点和治疗方向。

## 参考文献:

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] LEDERMANN J A, RAJA F A, FOTOPOULOU C, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. Annals of oncology, 2013, 24: vi24-vi32.
- [3] CHO K R, SHIH I M. Ovarian cancer [J]. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2009, 4: 287-313.
- [4] STEWART C, RALYEA C, LOCKWOOD S. Ovarian cancer: an integrated review [J]. Seminars in oncology nursing, 2019, 35(2): 151-156.
- [5] ZHOU J B, KANG Y, CHEN L, et al. The drug-resistance mechanisms of five platinum-based antitumor agents [J]. Frontiers in pharmacology, 2020, 11: 343.
- [6] ZHANG C Y, XU C, GAO X Y, et al. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies [J]. Theranostics, 2022, 12(5): 2115-2132.
- [7] MULLEN M M, KUROKI L M, THAKER P H. Novel treatment options in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: a review [J]. Gynecologic oncology, 2019, 152(2): 416-425.
- [8] LEDERMANN J A, RAJA F A, FOTOPOULOU C, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. Annals of oncology, 2018, 29(Suppl 4): iv259.
- [9] SONG M D, CUI M X, LIU K H. Therapeutic strategies to overcome cisplatin resistance in ovarian cancer [J]. European journal of medicinal chemistry, 2022, 232: 114205.
- [10] MARCHETTI C, DE FELICE F, ROMITO A, et al. Chemotherapy resistance in epithelial ovarian cancer: Mechanisms and emerging treatments [J]. Seminars in cancer biology, 2021, 77: 144-166.
- [11] LI H X, LI J H, GAO W L, et al. Systematic analysis of ovarian cancer platinum-resistance mechanisms via text mining [J]. Journal of ovarian research, 2020, 13(1): 27.
- [12] DAMIA G, BROGGINI M. Platinum resistance in ovarian cancer: role of DNA repair [J]. Cancers, 2019, 11(1): 119.
- [13] YAN H W, BU P C. Non-coding RNA in cancer [J]. Essays in biochemistry, 2021, 65(4): 625-639.
- [14] JOHN LIU S, DANG H X, LIM D A, et al. Long noncoding RNAs in cancer metastasis [J]. Nature reviews cancer, 2021, 21(7): 446-460.
- [15] ZHANG X Y, XIE K, ZHOU H H, et al. Role of non-coding RNAs and RNA modifiers in cancer therapy resistance [J]. Molecular cancer, 2020, 19(1): 47.
- [16] 蔡春蕾, 蔡国青, 徐 佳, 等. 长链非编码RNA HCG18 对人卵巢癌细胞顺铂耐药性的影响及其机制 [J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(11): 1108-1115.
- [17] 黄 宇, 谢 尧. lncRNA Linc01296 对卵巢癌细胞 OVCAR-3 顺铂耐药的影响及其与临床病理特征的关系 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(3): 323-327.
- [18] 栗浩然, 王雅莉, 李红娟, 等. lncRNA FAL1 通过调控 MAPK 通路对卵巢癌细胞化疗耐药性的影响及其机制 [J]. 肿瘤防治研究, 2021, 48(4): 333-340.
- [19] 刘正泰, 肖方祥, 王俊杰, 等. lncRNA KCNQ1OT1 在卵巢癌组织中的表达及对卵巢癌细胞顺铂耐药的作用 [J]. 肿瘤, 2019, 39(1): 51-60.
- [20] 李 幸, 魏雪晴, 王 丽, 等. lncRNA PVT1 及 PD-L1 表达与顺铂耐药上皮性卵巢癌临床病理特征及预后的相关性分析 [J]. 中国肿瘤临床, 2021, 48(2): 60-65.
- [21] 施丽州, 陈小英, 于 玥, 等. SNHG10 低表达与卵巢癌预后和耐药的相关性研究 [J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(2): 193-203.
- [22] DONG C H, YIN F Q, ZHU D, et al. NCALD affects drug



- resistance and prognosis by acting as a CeRNA of CX3CL1 in ovarian cancer[J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2020, 121(11): 4470-4483.
- [23] KE Y, CHEN X Y, SU Y T, et al. Low expression of SLC7A11 confers drug resistance and worse survival in ovarian cancer via inhibition of cell autophagy as a competing endogenous RNA[J]. *Frontiers in oncology*, 2021, 11: 744940.
- [24] LOWRY K P, LEE S I. Imaging and screening of ovarian cancer[J]. *Radiologic clinics of North America*, 2017, 55(6): 1251-1259.
- [25] 甘露, 郑洪. HOX 转录反义 RNA 在卵巢癌中的研究进展[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2022, 38(7): 850-855.
- [26] BAI L, WANG A H, ZHANG Y L, et al. Knockdown of MALAT1 enhances chemosensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin through inhibiting the Notch1 signaling pathway[J]. *Experimental cell research*, 2018, 366(2): 161-171.
- [27] LEVINE A J, OREN M. The first 30 years of p53: growing ever more complex[J]. *Nature reviews cancer*, 2009, 9(10): 749-758.
- [28] MANFREDI J J. p53 and apoptosis: it's not just in the nucleus anymore[J]. *Molecular cell*, 2003, 11(3): 552-554.
- [29] LIU Y Q, SU Z Y, TAVANA O, et al. Understanding the complexity of p53 in a new era of tumor suppression[J]. *Cancer cell*, 2024, 42(6): 946-967.
- [30] ZHANG Z Q, YUE P F, LU T Q, et al. Role of lysosomes in physiological activities, diseases, and therapy[J]. *Journal of hematology & oncology*, 2021, 14(1): 79.
- [31] TOPALIAN S L. Targeting immune checkpoints in cancer therapy[J]. *JAMA*, 2017, 318(17): 1647-1648.
- [32] HUANG Y D, CHEN L, GUO L B, et al. Evaluating DAPK as a therapeutic target[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(2): 371-386.
- [33] XU X J, WANG X Y, GENG C, et al. Long-chain non-coding RNA DAPK1 targeting miR-182 regulates pancreatic cancer invasion and metastasis through ROCK-1/rhoa signaling pathway[J]. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2017, 10(9): 9273-9283.
- [34] 赵晶, 刘海波, 习杰英. 多发性骨髓瘤患者中 LncRNA DAPK1-IT1 的表达与其临床意义研究[J]. *临床血液学杂志*, 2022, 35(3): 190-194.
- [35] ZHEN Z G, REN S H, JI H M, et al. The lncRNA DAPK-IT1 regulates cholesterol metabolism and inflammatory response in macrophages and promotes atherogenesis[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2019, 516(4): 1234-1241.

本文引用格式:

洪旖, 陈翠兰, 尹富强, 等. LncRNAs 调控卵巢癌细胞卡铂耐药的机制和功能研究[J]. *广西医科大学学报*, 2025, 42(1): 74-86. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.01.010

HONG Y, CHEN C L, YIN F Q, et al. Study on the mechanisms and functions of lncRNAs in regulating carboplatin resistance in ovarian cancer cells[J]. *Journal of Guangxi medical university*, 2025, 42(1): 74-86. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2025.01.010