

miR-214-3p 与 *EZH2* 的靶向关系及其对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

翟 丽¹, 陈 孟², 罗建波¹, 张爱利¹, 王良晓¹, 魏 颖¹, 张 曦¹

(1. 昆明医科大学第三附属医院 云南省肿瘤医院 北京大学肿瘤医院云南医院医学检验科, 云南 昆明 650118; 2. 云南省昆明市官渡区妇幼健康服务中心检验科, 云南 昆明 650200)

[摘 要] **目的:** 探讨微小RNA-214-3p (*miR-214-3p*) 和果蝇 *zeste* 基因增强子人类同源物 2 (*EZH2*) 之间的靶向关系, 并阐明其对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响。**方法:** 将人卵巢癌 SKOV3 细胞分为对照组、mimics 阴性对照 (NC) 组、*miR-214-3p* mimics 组、*miR-214-3p* mimics+过表达 NC (OE-NC) 组和 *miR-214-3p* mimics+过表达 *EZH2* (OE-*EZH2*) 组。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组细胞中 *miR-214-3p* 和 *EZH2* mRNA 表达水平, Western blotting 法检测各组细胞中 *EZH2* 蛋白表达水平。构建含 *EZH2* 野生型 (WT) 或突变型 (MT) 报告质粒, 与 *miR-214-3p* mimics 或 NC 共转染至 293T 细胞, 采用双荧光素酶报告基因实验检测各组细胞荧光素酶活性。采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测各组细胞活性, Transwell 小室实验检测各组侵袭细胞数, 流式细胞术检测各组细胞凋亡率和细胞周期分布。**结果:** 与对照组和 mimics NC 组比较, *miR-214-3p* mimics 组细胞中 *miR-214-3p* 表达水平明显升高 ($P<0.05$), *EZH2* mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$)。与 *miR-214-3p* mimics 组比较, *miR-214-3p* mimics+OE-*EZH2* 组细胞中 *miR-214-3p* 表达水平明显降低 ($P<0.05$), *EZH2* mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$)。与 pGL3-*EZH2*-WT+NC 组比较, pGL3-*EZH2*-WT+*miR-214-3p* mimics 组荧光素酶活性明显降低 ($P<0.05$)。与对照组和 mimics NC 组比较, *miR-214-3p* mimics 组细胞活性明显降低 ($P<0.05$), 侵袭细胞数明显减少 ($P<0.05$), 细胞凋亡率明显升高 ($P<0.05$), 细胞周期 G₁ 期细胞百分率明显升高 ($P<0.05$)。与 *miR-214-3p* mimics 组比较, *miR-214-3p* mimics+OE-*EZH2* 组细胞活性明显升高 ($P<0.05$), 侵袭细胞数明显增加 ($P<0.05$), 细胞凋亡率明显降低 ($P<0.05$)。**结论:** *miR-214-3p* 可靶向下调 *EZH2* 表达, 从而抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖和侵袭能力, 促进细胞凋亡。*EZH2* 过表达可拮抗 *miR-214-3p* 的抑癌作用, 进一步证实了二者间的靶向调控关系。

[关键词] 微小RNA-214-3p; 果蝇 *zeste* 基因增强子人类同源物 2; 卵巢肿瘤; 细胞增殖; 细胞侵袭; 细胞迁移

[中图分类号] R737.31 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2025-03-26 **[录用日期]** 2025-06-16

[基金项目] 云南省科技厅应用基础研究计划项目 (202101AY070001-165); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2024J0330)

[作者简介] 翟 丽 (1985—), 女, 云南省昆明市人, 主管检验师, 医学硕士, 主要从事肿瘤分子机制等方面的研究。

[通信作者] 魏 颖, 主管检验师 (E-mail: weiyi@kmmu.edu.cn);

张 曦, 副主任技师 (E-mail: zhangxi@kmmu.edu.cn)

Targeting relationship between *miR-214-3p* and *EZH2* and its effects on proliferation, invasion, and apoptosis of ovarian cancer SKOV3 cells

ZHAI Li¹, CHEN Meng², LUO Jianbo¹, ZHANG Aili¹, WANG Liangxiao¹, WEI Ying¹, ZHANG Xi¹

(1. Department of Medical Laboratory, Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Cancer Hospital, Peking University Cancer Hospital Yunnan, Kunming 650118, China;

2. Department of Laboratory, Maternal and Child Health Service Center, Guandu District, Kunming City, Yunnan Province, Kunming 650200, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the targeting relationship between microRNA-214-3p (*miR-214-3p*) and enhancer of zeste homolog 2 (*EZH2*), and to clarify its effects on the proliferation, invasion, and apoptosis of ovarian cancer SKOV3 cells. **Methods:** The human ovarian cancer SKOV3 cells were divided into control group, mimics negative control (NC) group, *miR-214-3p* mimics group, *miR-214-3p* mimics+overexpression NC (OE-NC) group, and *miR-214-3p* mimics+overexpression *EZH2* (OE-*EZH2*) group. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of *miR-214-3p* and *EZH2* mRNA in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of *EZH2* protein in the cells in various groups. Reporter plasmids containing wild-type (WT) or mutant-type (MT) *EZH2* were constructed and co-transfected with *miR-214-3p* mimics or NC into the 293T cells, and the dual-luciferase reporter gene assay was used to detect the luciferase activities of the cells in various groups. Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the activities of the cells in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the numbers of invasion cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates and cell cycle distribution of the cells in various groups. **Results:** Compared with control group and mimics NC group, the expression level of *miR-214-3p* in the cells in *miR-214-3p* mimics group was significantly increased ($P<0.05$), and the expression levels of *EZH2* mRNA and protein were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with *miR-214-3p* mimics group, the expression level of *miR-214-3p* in the cells in *miR-214-3p* mimics+OE-*EZH2* group was significantly decreased ($P<0.05$), and the expression levels of *EZH2* mRNA and protein were significantly increased ($P<0.05$). Compared with pGL3-*EZH2*-WT+NC group, the luciferase activity in the cells in pGL3-*EZH2*-WT+*miR-214-3p* mimics group was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with control group and mimics NC group, the activity of the cells in *miR-214-3p* mimics group was significantly decreased ($P<0.05$), the number of invasion cells was significantly decreased ($P<0.05$), the apoptotic rate was significantly increased ($P<0.05$), and the percentage of the cells at G₁ phase was significantly increased ($P<0.05$). Compared with *miR-214-3p* mimics group, the activity of the cells in *miR-214-3p* mimics+OE-*EZH2* group was significantly increased ($P<0.05$), the number of invasion cells was significantly increased ($P<0.05$), and the apoptotic rate was significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** *miR-214-3p* can down-regulate *EZH2* expression by targeting it, thereby inhibiting the proliferation and invasion abilities and promoting the apoptosis of ovarian cancer SKOV3 cells. Overexpression of *EZH2* can antagonize the tumor-suppressive effect of *miR-214-3p*, further confirming the targeting regulatory relationship between them.

KEYWORDS MicroRNA-214-3p; Enhancer of zeste homolog 2; Ovarian neoplasm; Cell proliferation; Cell invasion; Cell migration

2021年全球癌症统计数据显示:卵巢癌年致死病例约20万例^[1]。2023年^[2]我国数据显示:我国女性生殖系统肿瘤中,卵巢癌发病率位居第三名,死亡率居第二名。该疾病早期症状隐匿,缺乏有效筛查与诊断手段,预后较差。微小RNA-214-3p (microRNA-214-3p, *miR-214-3p*) 是脊椎动物特异性miRNA,位于*DNM3*基因第14号内含子区域,参与调控肿瘤细胞增殖、侵袭、细胞周期和凋亡等进程^[3]。果蝇*zeste*基因增强子人类同源物2 (enhancer of *zeste* homologue 2, *EZH2*) 是多梳蛋白复合体核心成员,其可通过组蛋白修饰抑制靶基因表达,调控细胞分化与生长^[4-5]。目前,*miR-214-3p*与*EZH2*之间的靶向调控关系尚不明确。本研究探讨*miR-214-3p*与*EZH2*的靶向关系,及其对卵巢癌SKOV3细胞增殖、侵袭和凋亡的影响,以期对卵巢癌诊疗提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人卵巢癌SKOV3细胞和人胚肾293T细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。*miR-214-3p*及其模拟物质粒*miR-214-3p* mimics由广州锐博生物科技有限公司设计合成。杜尔伯科改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 和胎牛血清购自美国Gibco公司, Lipofectamine™ 3000转染试剂购自美国Invitrogen公司, *EZH2*过表达质粒 (OE-*EZH2*)、*EZH2*野生型 (wild type, WT) 和突变型 (mutant type, MT) 荧光素酶报告基因质粒及海肾荧光素酶报告基因质粒由上海吉满生物科技有限公司构建, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国MedChemExpress公司, 膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶 (fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, FITC/PI) 细胞凋亡检测试剂盒购自上海七海复泰生物科技有限公司。细胞计数试剂盒8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂购自东仁化学科技(上海)有限公司, Transwell小室购自美国Corning公司, *EZH2*抗体购自北京博奥森生物技术有限公司 (使用浓度为1:2 000), 兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自上海艾比玛特医药科技有限公司 (使用浓度为1:1 000), 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗鼠IgG和抗兔IgG均购自美国Cell Signaling Technology公司 (使用浓度均为1:2 000)。

LightCycler® 96型实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪购自瑞士Roche公司, Implen超微量分光光度计购自德国Implen公司, Novocyte 2060R流式细胞仪购自无锡艾森生物有限公司。

1.2 细胞分组和处理 将SKOV3细胞接种至96孔细胞培养板, 培养至融合度约50%时, 采用Lipofectamine™ 3000进行转染。将细胞进行分组: ①对照组, 细胞未转染任何质粒; ②mimics阴性对照 (negative control, NC) 组, 细胞转染*miR-214-3p* NC质粒; ③*miR-214-3p* mimics组, 细胞转染*miR-214-3p* mimics质粒; ④*miR-214-3p* mimics+过表达NC (over-expression negative control, OE-NC) 组, 细胞共转染*miR-214-3p* mimics和OE-NC质粒; ⑤*miR-214-3p* mimics+OE-*EZH2*组, 共转染*miR-214-3p* mimics和OE-*EZH2*质粒。按照上述分组加入对应质粒, 每孔质粒用量为500 ng, 混匀后继续培养。

1.3 RT-qPCR法检测各组SKOV3细胞中*miR-214-3p*和*EZH2* mRNA表达水平 收集各组细胞, 使用TRIzol试剂提取总RNA。采用Bulge-Loop miRNA RT-qPCR Starter Kit完成*miR-214-3p*逆转录和RT-qPCR检测。反应条件: 95℃预变性10 min; 95℃变性2 s, 60℃退火20 s, 75℃延伸10 s, 共40个循环。以*U6*为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组细胞中*miR-214-3p*表达水平。

收集各组细胞, 使用TRIzol试剂提取总RNA。采用FastKing RT Kit (含基因组DNA核酸酶) 将*EZH2* RNA逆转录为cDNA, 采用Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒进行RT-qPCR检测。引物序列: *EZH2* F, 5'-AAGAA-GAAGAAGAGAAGAA-3', *EZH2* R, 5'-ATAG-TAAGTGCCAATGAG-3'; *GAPDH* F, 5'-TTG-CCCTCAACGACCACTTT-3', *GAPDH* R, 5'-TGGTCCAGGGGTCTTACTCC-3'。反应条件同上。以*GAPDH*为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组细胞中*EZH2* mRNA表达水平。

1.4 Western blotting法检测各组SKOV3细胞中*EZH2*蛋白表达水平 收集转染后的各组SKOV3细胞, 加入含蛋白酶抑制剂的放射性免疫沉淀分析缓冲液 (radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA) 裂解细胞, 采用IMPLEN超微量分光光度计测定蛋白浓度。样品经12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺

凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离后, 电转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 室温封闭 2 h, 以阻断非特异性结合。分别加入鼠抗 *EZH2* (1:2 000 稀释) 和兔抗 *GAPDH* (1:1 000), 4℃ 孵育过夜。洗膜后, 加入 HRP 标记的抗鼠 IgG 和抗兔 IgG (1:2 000), 室温孵育 2 h。加入增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 工作液显影成像。采用 Image J 软件分析各组目的蛋白条带灰度值, 以 *GAPDH* 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / *GAPDH* 蛋白条带灰度值。

1.5 *miR-214-3p* 靶基因预测 采用 TargetScan 数据库 (版本 7.2, http://www.targetscan.org/vert_72/) 在线分析工具, 以 *miR-214-3p* 为查询对象, 对其潜在靶基因进行预测分析。

1.6 双荧光素酶报告基因实验检测 *miR-214-3p* 与 *EZH2* 的靶向关系 构建 *EZH2* 野生型 3' 端非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) (*EZH2*-3'-UTR WT) 和突变型 3'-UTR (*EZH2*-3'-UTR MT) 荧光素酶报告基因质粒。取 293T 细胞接种至 96 孔细胞培养板, 随机分为 pGL3-*EZH2*-WT+NC 组 (共转染 *miR-214-3p* NC 和 *EZH2*-3'-UTR WT)、pGL3-*EZH2*-WT+*miR-214-3p* mimics 组 (共转染 *miR-214-3p* mimics 和 *EZH2*-3'-UTR WT)、pGL3-*EZH2*-MT+NC 组 (共转染 *miR-214-3p* NC 和 *EZH2*-3'-UTR MT) 及 pGL3-*EZH2*-MT+*miR-214-3p* mimics 组 (共转染 *miR-214-3p* mimics 和 *EZH2*-3'-UTR MT)。按分组转染后, 各组细胞于 37℃、5% CO₂ 培养 48 h。吸弃培养基, 加入磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 3 次。每孔加入 100 μL 细胞裂解缓冲液, 室温轻晃孵育 15 min。转移裂解液至离心管, 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清 20 μL 至黑色不透底酶标板。使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒, 每孔依次加入 100 μL 萤火虫荧光素酶检测工作液, 于酶标仪上测定萤火虫荧光强度, 以萤火虫荧光强度代表萤火虫荧光素酶活性 (fLuc); 再加入 100 μL 海肾荧光素酶检测工作液, 测定海肾荧光强度, 以海肾荧光强度代表海肾荧光素酶活性 (rLuc), 计算荧光素酶活性。荧光素酶活性 = fLuc/rLuc。

1.7 CCK-8 法检测各组 SKOV3 细胞活性 收集转

染后各组 SKOV3 细胞并计数后, 按每孔 3×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 100 μL 完全培养基。每组设 3 个复孔。将细胞培养板置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。每孔直接加入 10 μL CCK-8 溶液, 并设置不含细胞的空白对照孔 (仅含等体积培养基和 CCK-8 溶液)。将培养板放回培养箱, 避光孵育 2 h。采用酶标仪于 450 nm 波长处测定各孔吸光度 (A) 值, 计算细胞活性。细胞活性 = (实验孔 A 值 - 空白孔 A 值) / (对照孔 A 值 - 空白孔 A 值) × 100%。

1.8 Transwell 小室实验检测各组侵袭细胞数 收集各组细胞, 调整浓度至 1×10^5 mL⁻¹, 取 100 μL 细胞悬液接种于 Transwell-Matrigel 小室上室, 37℃ 培养箱孵育 48 h。取出小室, 吸干上室液体, 加入 200 μL 4% 多聚甲醛室温固定 30 min。固定后, 用棉签擦去 Matrigel 基质胶, 将小室置于 500 μL 结晶紫染色液中, 室温染色 15 min, PBS 缓冲液洗涤 3 次。于显微镜下观察并拍照, 采用 Image J 软件统计各组侵袭细胞数。

1.9 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 收集各组细胞, 加入 0.25% 胰酶消化 1~2 min, 加入 0.5 mL 完全培养基终止消化, 转移至 1.5 mL 离心管, 1 000 r·min⁻¹ 离心 3 min。弃上清, PBS 缓冲液洗涤后再次离心, 收集细胞。加入 400 μL Binding Buffer 重悬细胞。除未染色管和单染对照管外, 每管加入 5 μL FITC 染料和 10 μL PI 染料, 避光孵育 15 min。采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况, 计算细胞凋亡率。细胞凋亡率 = (凋亡细胞数 / 总细胞数) × 100%。

1.10 流式细胞术检测各组不同细胞周期 SKOV3 细胞百分率 收集各组细胞, 加入 0.25% 胰酶消化 1~2 min, 加入 0.5 mL 完全培养基终止消化。1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 预冷 PBS 缓冲液洗涤后再次离心, 收集细胞。加入 1 mL 预冷 70% 乙醇, 轻柔混匀, 4℃ 固定过夜。1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 预冷 PBS 缓冲液洗涤后离心收集细胞。加入 0.5 mL PI 染色液 (1 mL 染色缓冲液中含 25 μL PI 储存液和 20 μL 核糖核酸酶 A), 轻轻混匀, 重悬细胞, 37℃ 避光温浴 30 min。采用流式细胞术检测各组不同细胞周期 SKOV3 细胞百分率。

1.11 统计学分析 采用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 10.0 软件进行统计学分析。各组细胞中 *miR-214-3p* 和 *EZH2* mRNA 及蛋白表达水平、荧光素酶

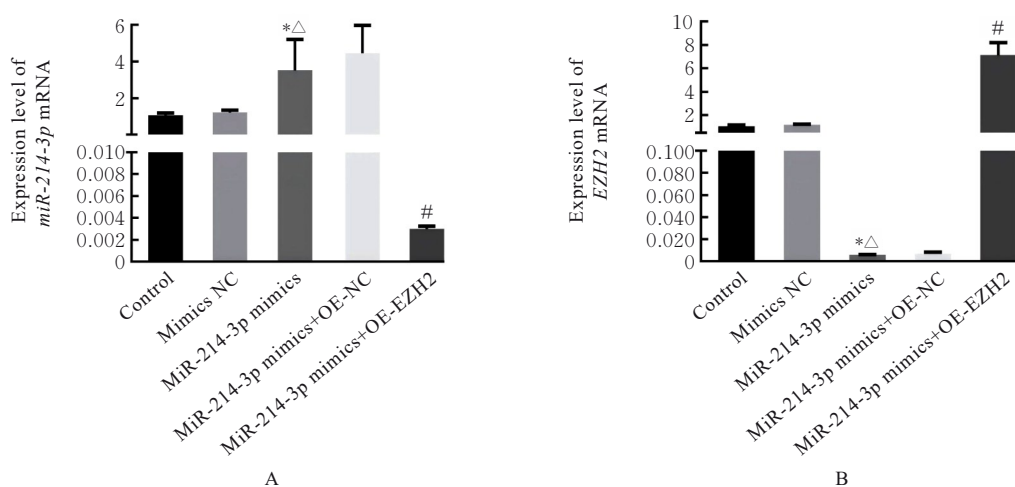
活性、细胞活性、侵袭细胞数、细胞凋亡率及不同细胞周期SKOV3细胞百分率均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组SKOV3细胞中miR-214-3p和EZH2 mRNA表达水平 与对照组和mimics NC组比较,miR-214-3p mimics组细胞中miR-214-3p表达水平明显升高($P < 0.05$),表明miR-214-3p过表达构建成功。与miR-214-3p mimics组比较,miR-214-3p mimics+

OE-EZH2组细胞中miR-214-3p表达水平明显降低($P < 0.05$)。与对照组和mimics NC组比较,miR-214-3p mimics组细胞中EZH2 mRNA明显降低($P < 0.05$)。与miR-214-3p mimics组比较,miR-214-3p mimics+OE-EZH2组细胞中EZH2 mRNA表达水平明显升高($P < 0.05$)。见图1。

2.2 各组SKOV3细胞中EZH2蛋白表达水平 与对照组和mimics NC组比较,miR-214-3p mimics组细胞中EZH2蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。与miR-214-3p mimics组比较,miR-214-3p mimics+OE-EZH2组细胞中EZH2蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。见图2。



A: MiR-214-3p mRNA; B: EZH2 mRNA. * $P < 0.05$ vs control group; Δ $P < 0.05$ vs mimics NC group; # $P < 0.05$ vs miR-214-3p mimics group.

图1 各组SKOV3细胞中miR-214-3p和EZH2 mRNA表达水平

Fig. 1 Expression levels of miR-214-3p and EZH2 mRNA in SKOV3 cells in various groups

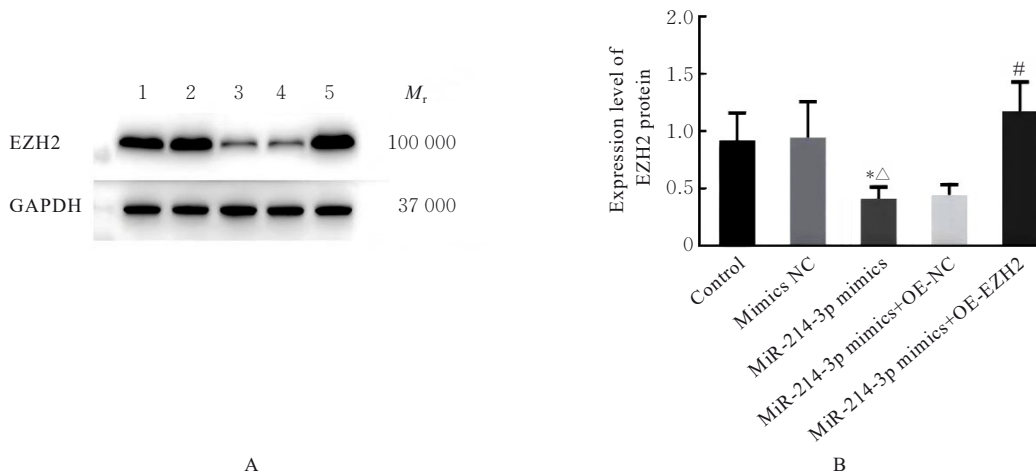
2.3 miR-214-3p靶基因预测和miR-214-3p与EZH2靶向关系验证 预测结果显示:miR-214-3p潜在结合EZH2的3'-UTR第161~168位序列,提示EZH2为miR-214-3p候选靶基因。见图3。双荧光素酶报告基因实验结果显示:与pGL3-EZH2-WT+NC组(0.83 ± 0.03)比较,pGL3-EZH2-WT+miR-214-3p mimics组细胞荧光素酶活性(0.63 ± 0.07)明显降低($P < 0.05$)。pGL3-EZH2-MT+miR-214-3p mimics组(0.82 ± 0.01)和pGL3-EZH2-MT+NC组(0.84 ± 0.04)细胞荧光素酶活性比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 各组SKOV3细胞活性 与对照组和mimics NC组比较,miR-214-3p mimics组细胞活性明显降低($P < 0.05$);与miR-214-3p mimics组比较,

miR-214-3p mimics+OE-EZH2组细胞活性明显升高($P < 0.05$)。见表1。

2.5 各组SKOV3细胞侵袭数 与对照组(104.00 ± 8.54 个)和mimics NC组(102.00 ± 3.61 个)比较,miR-214-3p mimics组侵袭细胞数(41.33 ± 4.04 个)明显减少($P < 0.05$)。与miR-214-3p mimic组(41.33 ± 4.04 个)和miR-214-3p mimics+OE-NC组(36.67 ± 4.16 个)比较,miR-214-3p mimics+OE-EZH2组侵袭细胞数(104.70 ± 6.11 个)明显增加($P < 0.05$)。见图4。

2.6 各组SKOV3细胞凋亡率 与对照组($6.57\% \pm 0.19\%$)和mimics NC组($7.15\% \pm 0.90\%$)比较,miR-214-3p mimics组细胞凋亡率($9.44\% \pm 0.79\%$)明显升高($P < 0.05$)。与miR-214-3p mimics组



Lane 1: Control group; Lane 2: Mimics NC group; Lane 3: MiR-214-3p mimics group; Lane 4: MiR-214-3p mimics+OE-NC group; Lane 5: MiR-214-3p mimics+OE-EZH2 group. * $P<0.05$ vs control group; $\Delta P<0.05$ vs mimics NC group; # $P<0.05$ vs miR-214-3p mimics group.

图2 各组SKOV3细胞中EZH2蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 2 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of EZH2 protein in SKOV3 cells in various groups



图3 *miR-214-3p*与*EZH2*预测结合位点

Fig. 3 Predicted binding site of *miR-214-3p* and *EZH2*

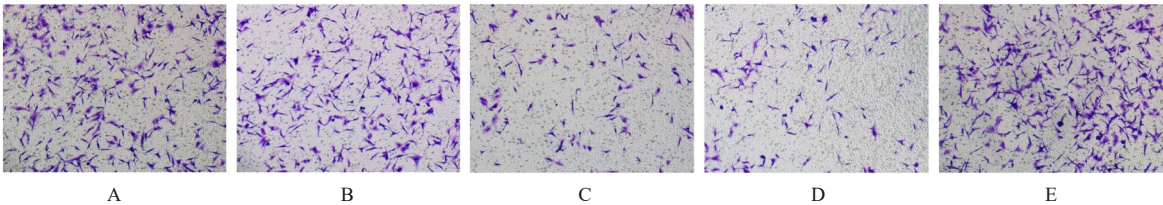
表1 各组SKOV3细胞活性
Tab. 1 Activities of SKOV3 cells in various groups
($n=3$, $\bar{x}\pm s$, $\eta/\%$)

Group	Activity
Control	98.16±4.27
Mimics NC	97.78±1.70
MiR-214-3p mimics	66.97±2.05 Δ
MiR-214-3p mimics+OE-NC	65.94±5.92
MiR-214-3p mimics+OE-EZH2	107.56±2.58 $\#$

* $P<0.05$ vs control group; $\Delta P<0.05$ vs mimics NC group; # $P<0.05$ vs miR-214-3p mimics group.

(9.44%±0.79%) 和 miR-214-3p mimics+OE-NC 组 (9.42%±1.25%) 比较, miR-214-3p mimics+OE-EZH2 组细胞凋亡率 (5.42%±0.28%) 明显降低 ($P<0.05$)。见图 5。

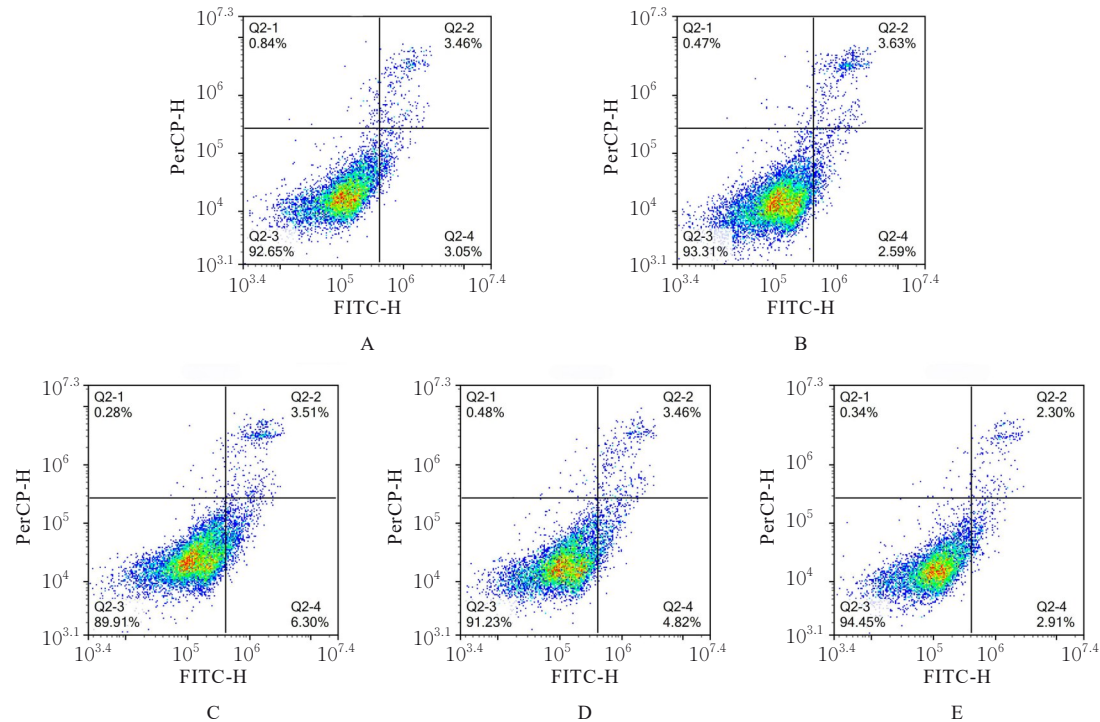
2.7 各组不同细胞周期 SKOV3 细胞百分率 与对照组和 mimics NC 组比较, miR-214-3p mimics 组 G_1 期 SKOV3 细胞百分率明显升高 ($P<0.05$), S 期和 G_2 期 SKOV3 细胞百分率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 miR-214-3p mimics 组比较, miR-214-3p mimics+OE-EZH2 组各细胞周期 SKOV3 细胞百分率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 6 和表 2。



A: Control group; B: Mimics NC group; C: MiR-214-3p mimics group; D: MiR-214-3p mimics+OE-NC group; E: MiR-214-3p mimics+OE-EZH2 group.

图4 各组SKOV3细胞侵袭情况(结晶紫, ×100)

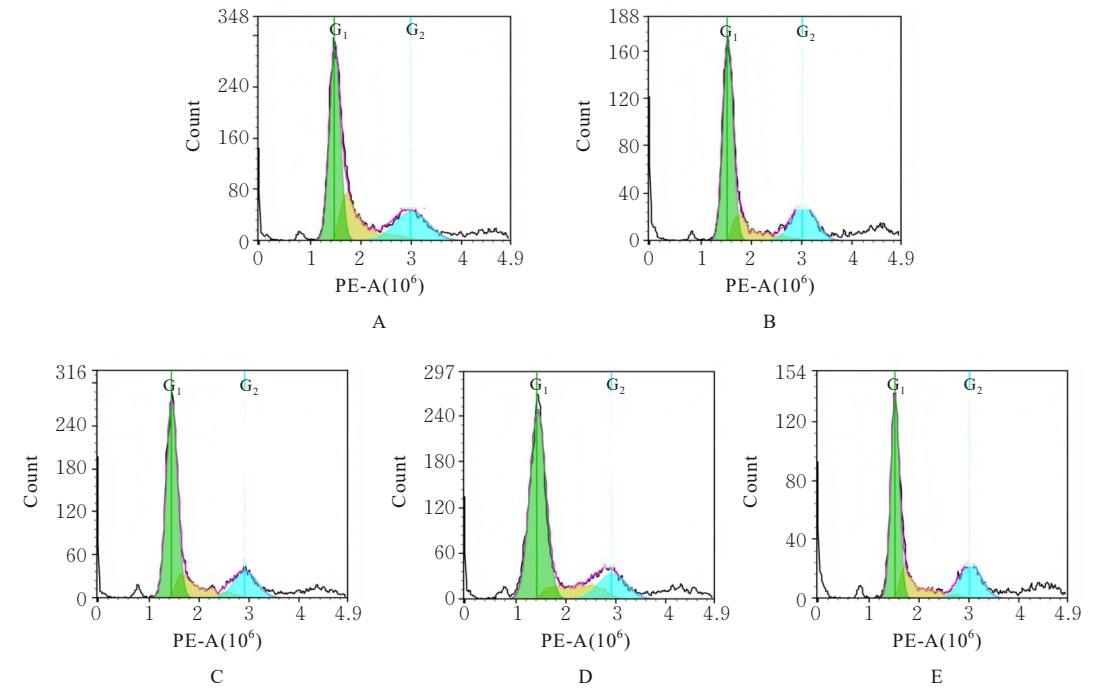
Fig. 4 Invasion of SKOV3 cells in various groups (Crystal violet, ×100)



A: Control group; B: Mimics NC group; C: MiR-214-3p mimics group; D: MiR-214-3p mimics+OE-NC group; E: MiR-214-3p mimics+OE-EZH2 group.

图 5 流式细胞术检测各组 SKOV3 细胞凋亡情况

Fig. 5 Apoptosis of SKOV3 cells in various groups detected by flow cytometry



A: Control group; B: Mimics NC group; C: MiR-214-3p mimics group; D: MiR-214-3p mimics+OE-NC group; E: MiR-214-3p mimics+OE-EZH2 group.

图 6 各组 SKOV3 细胞周期分布

Fig. 6 Cycle distribution of SKOV3 cells in various groups

表2 各组不同细胞周期SKOV3细胞百分率
Tab. 2 Percentages of SKOV3 cells at different cell cycles in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	G ₁ phase	S phase	G ₂ phase
Control	46.79±0.98	18.35±5.18	20.32±1.38
Mimics NC	47.93±0.70	17.26±5.33	18.01±3.64
MiR-214-3p mimics	54.88±0.53 ^{*△}	14.22±0.45	17.28±2.05
MiR-214-3p mimics+OE-NC	56.90±4.36	13.85±0.32	16.93±3.53
MiR-214-3p mimics+OE-EZH2	41.76±5.27	19.21±5.91	19.30±0.30

^{*} $P<0.05$ vs control group; [△] $P<0.05$ vs mimic NC group.

3 讨 论

*miR-214-3p*由反义非编码RNA *Dnm3os*编码,可促进HeLa细胞凋亡^[3]。本研究结果显示:过表达*miR-214-3p*可明显降低卵巢癌细胞活性和侵袭能力,促进细胞凋亡,提示其可抑制卵巢癌进展,这与LIU等^[6]研究结果一致。此外,*miR-214-3p*在肝癌^[7]、宫颈癌^[8]和肺癌^[9]中亦发挥抑癌作用,通过抑制肿瘤细胞增殖、迁移及诱导凋亡来抑制肿瘤进展。然而,*miR-214-3p*在鼻咽癌中呈高表达,且与预后不良有关联^[10],并可促进胃癌发生^[11],表明其功能具有肿瘤类型特异性。

EZH2作为癌相关蛋白,主要通过抑制抑癌基因表达、增强抗凋亡能力、调节转录机制和促进增殖及迁移等途径驱动肿瘤进展^[12-14]。本课题组前期研究^[15]发现:*EZH2*在卵巢癌组织和细胞中高表达,且与肿瘤恶性程度呈正相关关系。本研究结果显示:与对照组比较,miR-214-3p mimics组细胞中*EZH2* mRNA和蛋白表达水平明显降低,且其表达水平低于miR-214-3p mimics+OE-EZH2组;双荧光素酶实验结果进一步证实*EZH2*为*miR-214-3p*的靶基因。上述结果提示:*miR-214-3p*可通过结合*EZH2*基因的3'-UTR抑制其表达,从而降低miR-214-3p mimics组细胞中*EZH2*蛋白表达水平。而转染过表达*EZH2*质粒后,miR-214-3p mimics+OE-EZH2组卵巢癌细胞活性和侵袭能力明显升高,细胞凋亡率降低,表明*EZH2*过表达可部分抵消*miR-214-3p*的抑癌作用。然而,*EZH2*下调是否反向影响*miR-214-3p*在卵巢癌细胞中的功能,有待进一步研究。

miRNA作为一类拥有复杂调控网络的基因表达调控因子,其发挥作用可以通过直接参与调控多个不同基因的表达从而实现对细胞内信号转导的调控^[16]。胡双洁等^[17]研究显示:*miR-214-3p*低表达与乳腺癌进展有密切关联,且可通过调控铁死亡相

关蛋白通路影响乳腺癌细胞的铁死亡过程。研究^[18]显示:鼻咽癌干细胞中,环状核糖核酸001263和*miR-214-3p*信号通路可调控表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、无翅基因相关信号通路(Wingless-related integration site signaling pathway, Wnt)、音猬因子(Sonic Hedgehog, SHH)及骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)促进细胞凋亡。研究^[19]显示:宫颈癌细胞中,*miR-214-3p*可靶向抑制核因子κB激酶抑制蛋白β亚基编码基因(inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta gene, IKBKB)抑制细胞迁移和增殖能力。目前,*EZH2*与*miR-214-3p*的靶向调控机制研究较少。肝癌细胞中,敲低*miR-214-3p*可上调*EZH2*表达,进而促进癌细胞活性及侵袭能力^[20]。DERFOUL等^[21]研究发现:*miR-214-3p*通过靶向*EZH2*调控乳腺癌细胞增殖及凋亡;而*miR-214-3p*在卵巢癌中的负向调控信号通路及*EZH2*的下游效应机制尚未明确,需进一步解析其靶向基因及调控网络。

综上所述,*miR-214-3p*可通过靶向*EZH2*基因抑制卵巢癌细胞增殖和侵袭,促进细胞凋亡,从而发挥抑癌作用;*EZH2*过表达可部分逆转上述抗肿瘤效应。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

翟丽参与研究设计、实验操作和论文撰写,陈孟和罗建波参与实验操作,张爱利参与数据分析,王良晓参与论文审阅,魏颖和张曦参与研究设计、论文审阅及修改。

[参考文献]

[1] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Cancer statistics for the year 2020: an

- overview[J]. *Int J Cancer*, 2021, 149(4): 778-789.
- [2] 姜丹凤, 朱孟秀, 赵清娟, 等. 中国女性生殖系统肿瘤发病率和死亡率分析[J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(23): 4426-4431.
- [3] DONG X, MEN X, ZHANG W, et al. Advances in tumor markers of ovarian cancer for early diagnosis[J]. *Indian J Cancer*, 2014, 51(Suppl 3): e72-e76.
- [4] LIU Y K, YANG Q. The roles of EZH2 in cancer and its inhibitors[J]. *Med Oncol*, 2023, 40(6): 167.
- [5] KAUR P, SHANKAR E, GUPTA S. EZH2-mediated development of therapeutic resistance in cancer[J]. *Cancer Lett*, 2024, 586: 216706.
- [6] LIU Y, ZHOU H L, MA L, et al. MiR-214 suppressed ovarian cancer and negatively regulated semaphorin 4D[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6): 8239-8248.
- [7] 孙伟涛, 石彦科, 封俊连, 等. lncRNA MIR17HG调节miR-214-3p/RNF38信号轴对肝癌细胞恶性生物学行为的影响[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2024, 29(5): 565-571.
- [8] LIN M Y, LIU X L, GUO M P. The effect of regulating miR-214 on the biological behaviors of cervical cancer[J]. *Chin J Biomed Eng*, 2024, 33(04): 163-171.
- [9] 严涵, 郭绍兰, 戴学敏, 等. 红花苷联合miR-214对肺癌细胞增殖及凋亡的作用[J]. *河北医学*, 2024, 30(12): 1937-1945.
- [10] 尹艳辉, 吴爱军, 周玲芝. 鼻咽癌患者miR-214-3p表达意义及与预后的关系分析[J]. *现代医学*, 2022, 50(8): 974-979.
- [11] 周大新, 谢方利, 刘海科, 等. miR-214-3p通过靶向调节p53增强胃癌细胞的转移能力[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(5): 769-773.
- [12] 郭剑锋. EZH2调节P57的表达促进卵巢癌进展的体内外实验研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [13] 王俊杰, 蔡晶, 高艳萍, 等. 人卵巢癌细胞EZH2基因下调对E-钙粘蛋白表达的影响[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2013, 42(4): 382-385, 390.
- [14] 杨丹, 李凤, 杨斐斐, 等. BTK抑制剂联合基础化疗治疗初诊双表达弥漫性大B细胞淋巴瘤5例临床分析[J]. *中国实用内科杂志*, 2024, 44(1): 42-48.
- [15] ZHAI L, TAI W L, PAN Y Q, et al. Expression of EZH2 and P53 and their correlation in ovarian cancer tissues[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(3): 456-464.
- [16] AMIN M M J, TREVELYAN C J, TURNER N A. MicroRNA-214 in health and disease[J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3274.
- [17] 胡双洁, 章勇, 薄维波, 等. miR-214-3p在乳腺癌中的表达模式对铁死亡的影响及其与临床病理特征的相关性研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2024, 32(9): 1833-1840.
- [18] 孙海力, 李绍霄, 叶纪拓. circRNA001263-miR-214信号轴调控鼻咽癌干细胞信号通路的机制研究[J]. *健康研究*, 2024, 44(6): 675-682.
- [19] 黎康玲. miR-214-3p调控IKBKB基因抑制宫颈癌细胞的迁移及增殖[D]. 衡阳: 南华大学, 2024.
- [20] LIN T Y, DAI Y, GUO X L, et al. Silencing of hsa_circ_0008450 represses hepatocellular carcinoma progression through regulation of microRNA-214-3p/EZH2 axis[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 9133-9143.
- [21] DERFOUL A, JUAN A H, DIFILIPPANTONIO M J, et al. Decreased microRNA-214 levels in breast cancer cells coincides with increased cell proliferation, invasion and accumulation of the Polycomb Ezh2 methyltransferase[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(11): 1607-1614.