

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.04.006

· 基础研究 ·

## lncRNA NEAT1 通过 miR-1287-5p/DDIT4 轴调控卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、凋亡和侵袭

顾方,程红艳,吴琼,蒋韬,方恋(湖北医药学院附属随州医院 妇科,湖北 随州 441300)

**[摘要]** **目的:** 探讨 lncRNA 核内富集丰富转录本 1 (NEAT1) 调控 miR-1287-5p/DNA 损伤诱导转录本 4 (DDIT4) 轴对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响及其机制。**方法:** 收集 2023 年 6 月至 2024 年 6 月期间湖北医药学院附属随州医院手术切除的 27 例卵巢癌患者的癌及癌旁组织标本,以及正常人卵巢上皮细胞 IOSE80 和卵巢癌细胞系 SKOV3、CAOV3 和 A2780, RT-qPCR 检测卵巢癌组织与细胞中 lncRNA NEAT1、miR-1287-5p 及 DDIT4 mRNA 表达。将 SKOV3 细胞分为 Ctrl 组、si-NC 组、si-NEAT1 组、si-NEAT1 + anti-miR-NC 组、si-NEAT1 + anti-miR-1287-5p 组、si-NEAT1 + vector 组、si-NEAT1 + OE-DDIT4 组。CCK-8 法、克隆形成实验、流式细胞术、Transwell 实验分别检测各组细胞增殖、凋亡及侵袭能力, WB 法检测细胞中 DDIT4、细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1)、p53、迁移侵袭增强子 1 (MIEN1) 蛋白水平。双萤光素酶报告基因验证 lncRNA NEAT1 与 miR-1287-5p/DDIT4 靶向结合关系, RNA pull-down 实验、RNA 免疫沉淀实验分别验证 lncRNA NEAT1 与 miR-1287-5p、miR-1287-5p 与 DDIT4 的靶向结合关系。另设 pcDNA 组 (转染空载体 pcDNA3.1) 和 pc-NEAT1 组 (转染 pcDNA-NEAT1) 以验证 NEAT1 过表达效应。**结果:** 卵巢癌组织中 lncRNA NEAT1、DDIT4 mRNA 表达水平显著高于癌旁组织 ( $P < 0.05$ ), 而 miR-1287-5p 表达显著低于癌旁组织 ( $P < 0.05$ )。敲低 lncRNA NEAT1 后, 与 Ctrl 组和 si-NC 组相比, si-NEAT1 组 lncRNA NEAT1 表达、DDIT4 mRNA 表达均显著降低 (均  $P < 0.05$ ), miR-1287-5p 表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 而过表达 lncRNA NEAT1 则下调 miR-1287-5p 表达并上调 DDIT4 表达, 呈现与敲低实验相反的调控效应; 敲低 lncRNA NEAT1 后, 克隆形成数、细胞增殖活性、细胞侵袭数均显著降低 (均  $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ ); DDIT4、cyclin D1、MIEN1 蛋白表达均显著降低 (均  $P < 0.05$ ), p53 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ )。进一步实验证实, anti-miR-1287-5p 或 OE-DDIT4 均可减弱 si-NEAT1 对 SKOV3 细胞增殖和侵袭的抑制作用, 同时减弱其对细胞凋亡的促进作用。lncRNA NEAT1 靶向调控 miR-1287-5p/DDIT4。**结论:** lncRNA NEAT1 通过靶向调控 miR-1287-5p/DDIT4 轴促进 SKOV3 细胞增殖和侵袭, 抑制细胞凋亡。

**[关键词]** lncRNA 核内富集丰富转录本 1; miR-1287-5p; DNA 损伤诱导转录本 4; 卵巢癌; SKOV3 细胞; 增殖; 凋亡; 侵袭**[中图分类号]** R737.31; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 04-0400-08

## lncRNA NEAT1 regulates the proliferation, apoptosis and invasion of ovarian cancer SKOV3 cells through the miR-1287-5p/DDIT4 axis

GU Fang, CHENG Hongyan, WU Qiong, JIANG Tao, FANG Lian (Department of Gynecology, Suizhou Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Suizhou 441300, Hubei, China)

**[Abstract] Objective:** To explore the effects and mechanisms by which lncRNA nuclear enriched transcript 1 (NEAT1) regulating the miR-1287-5p/DNA damage inducible transcript 4 (DDIT4) axis on the proliferation, apoptosis and invasion of ovarian cancer SKOV3 cells. **Methods:** Tissue samples of cancer and adjacent tissues from 27 patients with ovarian cancer who underwent surgery at Suizhou Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine between June 2023 and June 2024 were collected. Normal human ovarian epithelial cells IOSE80 and ovarian cancer cells SKOV3, CAOV3 and A2780 were also collected. RT-qPCR was used to detect the expressions of lncRNA NEAT1, miR-1287-5p and DDIT4 mRNA in ovarian cancer tissues and cells. SKOV3 cells were divided into the Ctrl group, the si-NC group, the si-NEAT1 group, the si-NEAT1 + anti-miR-NC group, the si-NEAT1 + anti-miR-1287-5p group, the si-NEAT1 + vector group, and the si-NEAT1 + OE-DDIT4 group. The CCK-8 assay, colony formation assay, flow cytometry, and Transwell assay were used to detect the proliferation, apoptosis, and invasion abilities of cells in each group. The WB method was used to detect the protein levels of DDIT4, cyclin D1, p53, and migration-invasion enhancer 1 (MIEN1) in the cells. The dual-luciferase reporter gene was used to verify the targeted binding relationship between lncRNA NEAT1 and miR-1287-5p/DDIT4. The RNA pull-down experiment

**[基金项目]** 随州市卫生健康委员会科技项目(2018SZ32008)**[作者简介]** 顾方, 硕士, 副主任医师**[通信作者]** 方恋(扫码获取作者通信方式)

and RNA immunoprecipitation experiment were used respectively to verify the target binding relationships between lncRNA NEAT1 and miR-1287-5p, and between miR-1287-5p and DDIT4. Additionally, the pcDNA group (transfected with empty vector pcDNA3.1) and the pc-NEAT1 group (transfected with pcDNA-NEAT1) were established to validate the overexpression effects of NEAT1. **Results:** The expression levels of lncRNA NEAT1 and DDIT4 mRNA in ovarian cancer tissues were significantly higher than those in adjacent tissues ( $P < 0.05$ ), while the expression level of miR-1287-5p was significantly lower than that in adjacent tissues ( $P < 0.05$ ). After knockdown of lncRNA NEAT1, compared with those in the Ctrl group and the si-NC group, the expressions of lncRNA NEAT1 and DDIT4 mRNA, the number of colony formation, the cell proliferation activity, the number of cell invasion, and the expressions of DDIT4, cyclin D1, and MIEN1 proteins in the si-NEAT1 group all decreased significantly (all  $P < 0.05$ ), while the expression of miR-1287-5p, the apoptosis rate, and the expression of p53 protein increased significantly (all  $P < 0.05$ ). Conversely, overexpression of lncRNA NEAT1 decreased miR-1287-5p expression and increased DDIT4 expression, showing opposite regulatory effects to the knockdown experiment. Further experiments proved that anti-miR-1287-5p or OE-DDIT4 might weaken the inhibitory effect of si-NEAT1 on the proliferation and invasion of SKOV3 cells, as well as its promoting effect on cell apoptosis. lncRNA NEAT1 targetedly regulates miR-1287-5p/DDIT4. **Conclusion:** lncRNA NEAT1 enhances SKOV3 cell proliferation and invasion, and inhibits cell apoptosis by targeting regulating the miR-1287-5p/DDIT4 axis.

**[Key words]** lncRNA nuclear enriched abundant transcript 1 (lncRNA NEAT1); miR-1287-5p; DNA damage inducible transcript 4 (DDIT4); ovarian cancer; SKOV3 cell; proliferation; apoptosis; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(4): 400-407. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.04.006]

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一, 其起病隐匿且预后不良, 严重威胁女性健康<sup>[1]</sup>。目前, 卵巢癌的治疗策略包括手术、放疗和化疗, 尽管上述治疗方法在改善患者预后方面取得了一定成效, 但晚期卵巢癌患者的生存率仍然较低<sup>[2-3]</sup>。因此, 确定有效的生物标志物并探索其分子机制, 对于丰富卵巢癌治疗手段具有重要意义。肿瘤细胞增殖、凋亡和侵袭过程需要 lncRNA 的调控, 提示其在肿瘤治疗中作为潜在治疗靶标的重要性<sup>[4]</sup>。核内富集丰富转录本 1 (nuclear enriched abundant transcript 1, NEAT1) 是一种在多种肿瘤中表达失调的 lncRNA。已有研究<sup>[5]</sup>表明, 抑制 NEAT1 能够有效抑制卵巢癌细胞的增殖并诱导其凋亡, 但具体的分子机制尚未完全阐明。研究显示, miR-1287-5p 在卵巢癌中是一个潜在的功能性 miRNA<sup>[6]</sup>; 同时, 在宫颈癌的相关研究中发现, DNA 损伤诱导转录本 4 (DNA damage inducible transcript 4, DDIT4) 在特定信号通路 (主要组织相容性复合体 I 类多肽相关序列 5/miR-139-5p) 中发挥关键调控作用, 其表达变化与癌细胞生物学行为密切相关<sup>[7]</sup>。上述研究提示, miR-1287-5p 与 DDIT4 在妇科肿瘤中可能扮演重要角色。生物信息学分析预测, NEAT1 与 miR-1287-5p、miR-1287-5p 与 DDIT4 之间均存在结合位点, 提示三者可能构成一个调控轴。然而, NEAT1 是否通过调控 miR-1287-5p/DDIT4 轴影响卵巢癌细胞增殖、凋亡和侵袭, 目前尚不清楚。因此, 本研究旨在探究 lncRNA NEAT1 对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响及其可能的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本、细胞及主要试剂

收集 2023 年 6 月至 2024 年 6 月期间湖北医药学院附属随州医院妇科手术切除的 27 例卵巢癌患者的癌及邻近的癌旁组织标本。所有患者术前均未接受放疗等治疗。组织样本采集前, 所有患者知情并签署知情同意书, 研究方案获得所在医院伦理委员会的批准 (伦理审查批件号: 2023-039)。

正常人卵巢上皮细胞 IOSE80 和人卵巢癌细胞 SKOV3、CAOV3 和 A2780 均购自武汉尚恩生物技术有限公司。

TRIzol 试剂购自北京云肽生物科技有限公司, CCK-8 试剂盒购自上海康朗生物科技有限公司, Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自上海复泰生物科技有限公司, si-NC、si-NEAT1、inhibitor NC、pcDNA、miR-1287-5p inhibitor、OE-DDIT4 质粒均购自上海碧云天生物技术有限公司, RT-qPCR 试剂盒购自上海自翊圣生物公司, 兔源抗 DDIT4、细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1)、p53、迁移侵袭增强子 1 (migration and invasion enhancer 1, MIEN1)、GAPDH 一抗及山羊抗兔二抗均购自英国 Abcam 公司。

### 1.2 细胞培养、分组及转染

将 SKOV3 细胞分为空白对照 (Ctrl) 组 (未转染)、si-NC 组 (转染阴性对照 siRNA)、si-NEAT1 组 (转染 si-NEAT1)、si-NEAT1 + anti-miR-NC 组 (si-NEAT1 与 inhibitor NC 共转染)、si-NEAT1 + anti-miR-1287-5p 组 (si-NEAT1 和 miR-1287-5p inhibitor 共转染)、si-NEAT1 + vector 组 (si-NEAT1 和空载体 pcDNA3.1 共转染)、si-NEAT1 + OE-DDIT4 组 (si-NEAT1 和 OE-DDIT4 质粒共转染)。另取 SKOV3 细胞, 分为 Ctrl 组 (未转染)、pcDNA 组 (转染

pcDNA3.1)、pc-NEAT1 组(转染 pcDNA-NEAT1)。Ctrl 组常规培养不处理,其余各组分别将相应的质粒采用脂质体转染法转染到 SKOV3 细胞,培养 48 h 后进行后续实验。

### 1.3 RT-qPCR 法检测卵巢癌组织和细胞中 lncRNA NEAT1、miR-1287-5p 及 DDIT4 mRNA 表达水平

用 TRIzol 提取卵巢癌组织及细胞中总 RNA,通过逆转录反应合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR。PCR 反应条件:95 °C 30 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s,共 40 个循环。引物序列:lncRNA NEAT1 正向引物为 5'-TGGCTAGCTCAGGGCTTCAG-3',反向引物为 5'-TCTCCTTGCCAAGCTTCCTTC-3'; miR-1287-5p 正向引物为 5'-GCTGGATCAGTGGTTCG-3',反向引物为 5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3'; DDIT4 正向引物为 5'-TGCATTGGGGACACATACCC-3',反向引物为 5'-CCCAAGTGATCCCTGACACC-3'; U6 正向引物为 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT-3',反向引物为 5'-CGCTTACGAATTTGCGTGTTCAT-3'; GAPDH 正向引物为 5'-GGAGCCAAAAGGGTCATC-3',反向引物为 5'-CCAGTGAGCTTCCCGTTC-3'。以 GAPDH 为内参检测 lncRNA NEAT1 和 DDIT4 mRNA 的表达,以 U6 为内参检测 miR-1287-5p 的表达,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因的相对表达水平。

### 1.4 CCK-8 法检测 SKOV3 细胞的增殖活性

取各组对数生长期 SKOV3 细胞,以  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96 孔板中,每组设置 6 个复孔,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h。向各孔加入 10 μL CCK-8 溶液,作用 2 h 后,用酶标仪测定 450 nm 处光密度(D)值,以 D 值表示细胞的增殖活性。

### 1.5 克隆形成实验检测 SKOV3 细胞的克隆形成能力

取各组 SKOV3 细胞,按照 500 个/皿的密度接种于 3.5 cm 培养皿中,置于含 10% 胎牛血清的完全培养基中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中连续培养 14 d,每 3 d 更换一次培养基。培养结束后用 PBS 洗涤去除残留培养基。4% 多聚甲醛室温固定 15 min,0.1% 结晶紫染色 30 min,自然干燥后拍照并统计克隆形成数目。

### 1.6 流式细胞术检测 SKOV3 细胞的凋亡水平

收集各组 SKOV3 细胞,用预冷的 PBS 洗涤后,重悬于 400 μL 1 × 结合缓冲液中。加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,避光作用 15 min,用流式细胞仪检测细胞的凋亡水平,使用 FlowJo 软件分析细胞凋亡率。

### 1.7 Transwell 实验检测 SKOV3 细胞的侵袭能力

将各组用无血清培养基悬浮的 SKOV3 细胞( $1 \times 10^5$  个/mL, 200 μL)添加到预铺基质胶的

Transwell 上室中,下室中加入 600 μL 含 10% 胎牛血清的培养基。培养 24 h 后,取出小室,将侵入下室的细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min,0.1% 结晶紫室温染色 30 min。洗涤后,在光学显微镜下计数侵袭细胞数。

### 1.8 WB 法检测 SKOV3 细胞中 DDIT4、cyclin D1、p53 和 MIEN1 蛋白的表达水平

采用 RIPA 缓冲液提取各组 SKOV3 细胞总蛋白,BCA 法测量蛋白质浓度。取 50 μg 蛋白进行上样,经 10% SDS-PAGE 电泳分离后,将蛋白条带转印至 PVDF 膜。在 5% 脱脂牛奶室温封闭膜 2 h,加入 DDIT4 (1:2 000)、cyclin D1 (1:1 000)、p53 (1:6 000)、MIEN1 (1:5 000)、GAPDH (1:6 000) 一抗,4 °C 下反应过夜。洗膜 3 次(每次 5 min),加入山羊抗兔二抗 (1:5 000),在室温下处理 2 h。洗膜后,采用 ECL 化学发光法显色,使用 ImageJ 软件分析蛋白条带的灰度值。

### 1.9 双萤光素酶报告基因实验验证 lncRNA NEAT1 与 miR-1287-5p 及 miR-1287-5p 与 DDIT4 的靶向关系

将 lncRNA NEAT1-野生型(WT)、lncRNA NEAT1-突变型(MUT)、DDIT4-WT 和 DDIT4-MUT 片段分别插入 PsiCHECK-2 载体以构建双萤光素酶报告质粒。将 SKOV3 细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔板中,培养至 70% 汇合度时,将 lncRNA NEAT1-WT、lncRNA NEAT1-MUT、DDIT4-WT、DDIT4-MUT 质粒分别与 miR-1287-5p mimic 或 mimic NC 共转染 SKOV3 细胞,24 h 后检测萤光素酶活性。

### 1.10 RNA 下拉(pull-down)实验检测 lncRNA NEAT1 与 miR-1287-5p 的靶向关系

将生物素标记的野生型 miR-1287-5p(bio-miR-1287-5p-WT)、突变型 miR-1287-5p(bio-miR-1287-5p-MUT)及阴性对照(bio-miR-NC)转染至 SKOV3 细胞。转染 24 h 后收集细胞并进行裂解,向细胞裂解液中加入 M-280 链霉亲和素磁珠,室温孵育 3 h。磁珠分离后充分洗涤磁珠,随后取磁珠上的 RNA,采用 RT-qPCR 检测富集 lncRNA NEAT1 表达水平。为校正实验样本中目标 RNA 的初始含量差异、排除非特异性结合干扰,实验同步设置 Input 对照:取转染后未进行磁珠孵育的细胞裂解液,直接提取总 RNA 进行 RT-qPCR 检测,作为 lncRNA NEAT1 的初始表达参照。采用以下公式计算 lncRNA NEAT1 的富集效率:富集效率(%)=(Pull-down 组 lncRNA NEAT1 相对表达量/Input 组 lncRNA NEAT1 相对表达量) × 100%。

### 1.11 RNA 免疫沉淀(RIP)测定 miR-1287-5p 与 DDIT4 靶向关系

采用 RNA 免疫沉淀裂解缓冲液处理 SKOV3 细

胞, 获取细胞裂解液。将裂解液分为两份, 分别加入 DDIT4 一抗和 IgG(阴性对照), 于 4 °C 下旋转孵育过夜。随后加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 100 °C 煮沸 10 min, 并使用 TRIzol 试剂提取 RNA。最后, 通过 RT-qPCR 法检测免疫沉淀产物中 miR-1287-5p 表达水平。

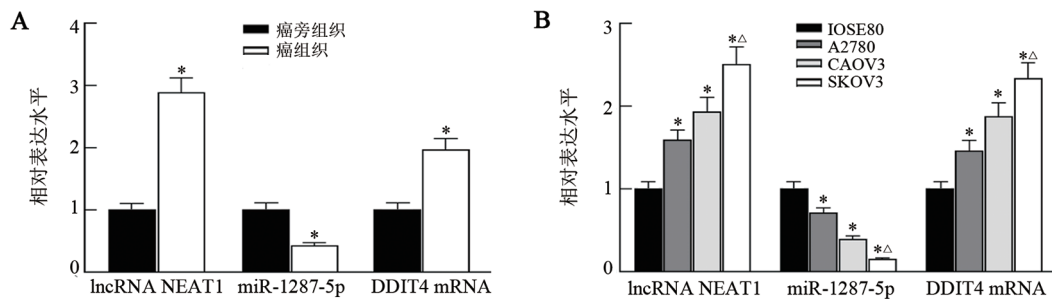
### 1.12 统计学处理

以上主要实验均独立重复 6 次。采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间数据比较采用 *t* 检验, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 卵巢癌组织和细胞系中 lncRNA NEAT1、DDIT4 mRNA 表达上调, miR-1287-5p 表达下调

RT-qPCR 法检测结果(图 1)显示, 与癌旁组织相比, 卵巢癌组织中 lncRNA NEAT1 与 DDIT4 mRNA 表达显著升高(均  $P < 0.05$ ), miR-1287-5p 表达显著降低( $P < 0.05$ ); 与 IOSE80 细胞相比, 卵巢癌 A2780、CAOV3 和 SKOV3 细胞中 lncRNA NEAT1 与 DDIT4 mRNA 表达均显著增加(均  $P < 0.05$ ), miR-1287-5p 表达显著减少(均  $P < 0.05$ ), 以在 SKOV3 细胞中 lncRNA NEAT1 与 DDIT4 mRNA 的上调水平及 miR-1287-5p 的下调水平最为显著(与 A2780 和 CAOV3 相比, 均  $P < 0.05$ ), 因此选择 SKOV3 细胞进行后续功能实验。



A: lncRNA NEAT1、miR-1287-5p 与 DDIT4 mRNA 在卵巢癌组织的表达水平; B: lncRNA NEAT1、miR-1287-5p 与 DDIT4 mRNA 在卵巢癌细胞系中的表达。与癌旁组织或 IOSE80 细胞比较, \* $P < 0.05$ ; 与 A2780 或 CAOV3 细胞比较,  $\Delta P < 0.05$ 。

图 1 RT-qPCR 法检测卵巢癌组织和细胞中 lncRNA NEAT1、miR-1287-5p 及 DDIT4 mRNA 表达水平

### 2.2 抑制 lncRNA NEAT1 可下调 SKOV3 细胞 NEAT1 及 DDIT4 mRNA 表达, 上调 miR-1287-5p 的表达

RT-qPCR 法检测结果(图 2A)显示, 与 Ctrl 组和 si-NC 组相比, si-NEAT1 组 SKOV3 细胞中 NEAT1 与 DDIT4 mRNA 表达均显著降低(均  $P < 0.05$ ), 而 miR-1287-5p 表达显著升高( $P < 0.05$ ); 与 si-NEAT1 组和 si-NEAT1 + anti-miR-NC 组相比, si-NEAT1 + anti-miR-1287-5p 组细胞中 DDIT4 mRNA 表达显著升高( $P < 0.05$ ), 而 miR-1287-5p 表达显著降低( $P < 0.05$ ); 与 si-NEAT1 组和 si-NEAT1 + vector 组相比, si-NEAT1 + OE-DDIT4 组细胞中 DDIT4 mRNA 表达显著升高( $P < 0.05$ )。结果表明, 敲低 NEAT1 可通过上调 miR-1287-5p 抑制 DDIT4 表达, 而同时抑制 miR-1287-5p 或过表达 DDIT4 可部分逆转上述效应。

### 2.3 抑制 lncRNA NEAT1 降低 SKOV3 细胞的增殖能力

CCK-8 法(图 2B)和克隆形成实验(图 2C)检测结果显示, 与 Ctrl 组和 si-NC 组相比, si-NEAT1 组 SKOV3 细胞增殖活力、克隆形成数目均显著降低(均  $P < 0.05$ ); 与 si-NEAT1 组和 si-NEAT1 + anti-miR-NC 组相比, si-NEAT1 + anti-miR-1287-5p 组细胞增殖

活力、克隆形成数目均显著升高(均  $P < 0.05$ ); 与 si-NEAT1 组和 si-NEAT1 + vector 组相比, si-NEAT1 + OE-DDIT4 组细胞增殖活力、克隆形成数目均显著升高(均  $P < 0.05$ )。结果表明, 敲低 NEAT1 可抑制 SKOV3 细胞增殖能力, 而同时抑制 miR-1287-5p 或过表达 DDIT4 均可部分逆转该效应。

### 2.4 抑制 lncRNA NEAT1 促进 SKOV3 细胞凋亡

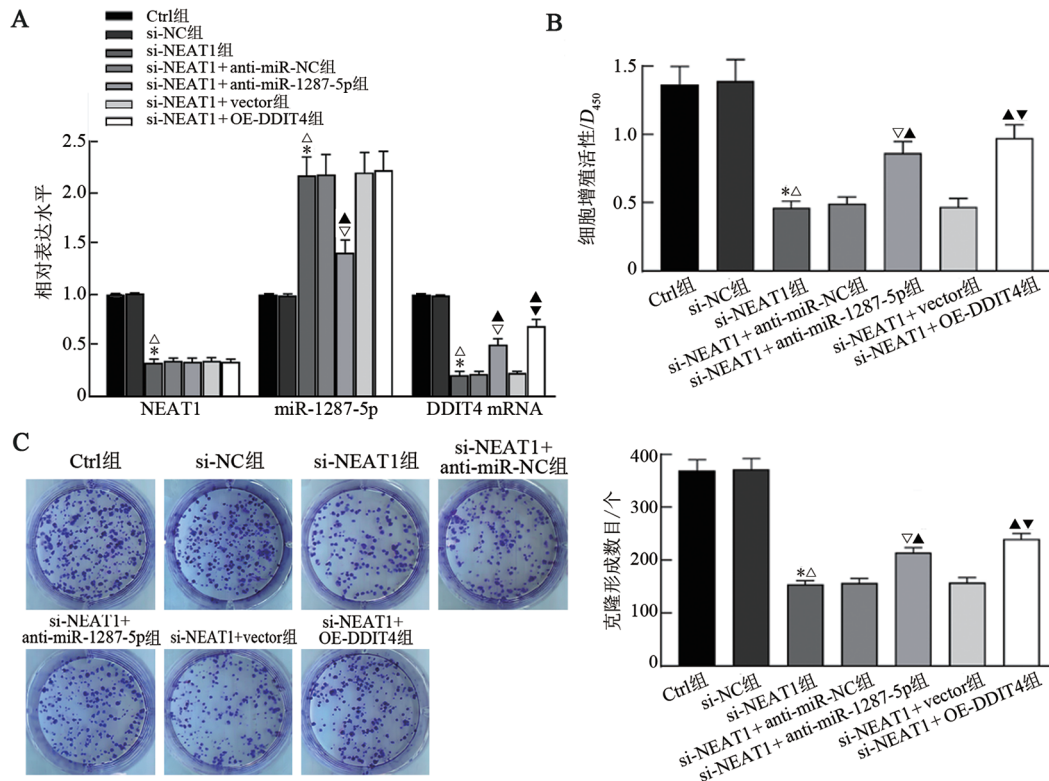
流式细胞术检测结果(图 3A)显示, 与 Ctrl 组和 si-NC 组相比, si-NEAT1 组 SKOV3 细胞凋亡率显著升高( $P < 0.05$ ); 与 si-NEAT1 组和 si-NEAT1 + anti-miR-NC 组相比, si-NEAT1 + anti-miR-1287-5p 组细胞凋亡率显著降低( $P < 0.05$ ); 与 si-NEAT1 组和 si-NEAT1 + vector 组相比, si-NEAT1 + OE-DDIT4 组细胞凋亡率显著降低( $P < 0.05$ )。结果表明, 敲低 lncRNA NEAT1 可促进 SKOV3 细胞凋亡, 而同时抑制 miR-1287-5p 或过表达 DDIT4 均可部分逆转该效应。

### 2.5 抑制 lncRNA NEAT1 降低 SKOV3 细胞的侵袭能力

Transwell 实验检测结果(图 3B)显示, 与 Ctrl 组和 si-NC 组相比, si-NEAT1 组侵袭细胞数显著降低(均  $P < 0.05$ ); 与 si-NEAT1 组和 si-NEAT1 + anti-miR-NC

组相比, si-NEAT1 + anti-miR-1287-5p 组侵袭细胞数显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 si-NEAT1 组和 si-NEAT1 + vector 组相比, si-NEAT1 + OE-DDIT4 组侵袭细胞数

升高 ( $P < 0.05$ )。结果表明, 敲低 lncRNA NEAT1 可抑制 SKOV3 细胞侵袭能力, 而同时抑制 miR-1287-5p 或过表达 DDIT4 均可部分逆转上述效应。



A: RT-qPCR 法检测细胞中 NEAT1、miR-1287-5p 及 DDIT4 mRNA 表达; B: CCK-8 法检测细胞的增殖活性; C: 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力。与 Ctrl 组比较,  $P < 0.05$ ; 与 si-NC 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 si-NEAT1 组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$ ; 与 si-NEAT1 + anti-miR-NC 组比较,  $\nabla P < 0.05$ ; 与 si-NEAT1 + vector 组比较,  $\blacktriangledown P < 0.05$ 。

图2 抑制 lncRNA NEAT1 对各组 SKOV3 细胞中 lncRNA NEAT1、miR-1287-5p 及 DDIT4 mRNA 表达的影响

### 2.6 抑制 lncRNA NEAT1 可下调 SKOV3 细胞中 DDIT4、cyclin D1 和 MIEN1 蛋白, 上调 p53 蛋白

WB 法检测结果 (图 3C) 显示, 与 Ctrl 组和 si-NC 组相比, si-NEAT1 组 SKOV3 细胞中 DDIT4、cyclin D1、MIEN1 蛋白表达均显著降低 (均  $P < 0.05$ ), p53 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 si-NEAT1 组、si-NEAT1 + anti-miR-NC 组相比, si-NEAT1 + anti-miR-1287-5p 组细胞中 DDIT4、cyclin D1、MIEN1 蛋白表达均显著升高 (均  $P < 0.05$ ), p53 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 si-NEAT1 组、si-NEAT1 + vector 组相比, si-NEAT1 + OE-DDIT4 组 DDIT4、cyclin D1、MIEN1 蛋白表达均显著升高 (均  $P < 0.05$ ), p53 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。结果表明, 敲低 lncRNA NEAT1 可下调 SKOV3 细胞中 DDIT4、cyclin D1 和 MIEN1 蛋白, 上调 p53 蛋白, 而同时抑制 miR-1287-5p 或过表达 DDIT4 均可部分逆转该效应。

### 2.7 lncRNA NEAT1 可调控 miR-1287-5p/DDIT4 轴

基于 StarBase 数据库生物信息学分析预测, 发现 lncRNA NEAT1 与 miR-1287-5p 及 miR-1287-5p 与

DDIT4 mRNA 的 3'UTR 均存在潜在结合位点 (图 4A)。

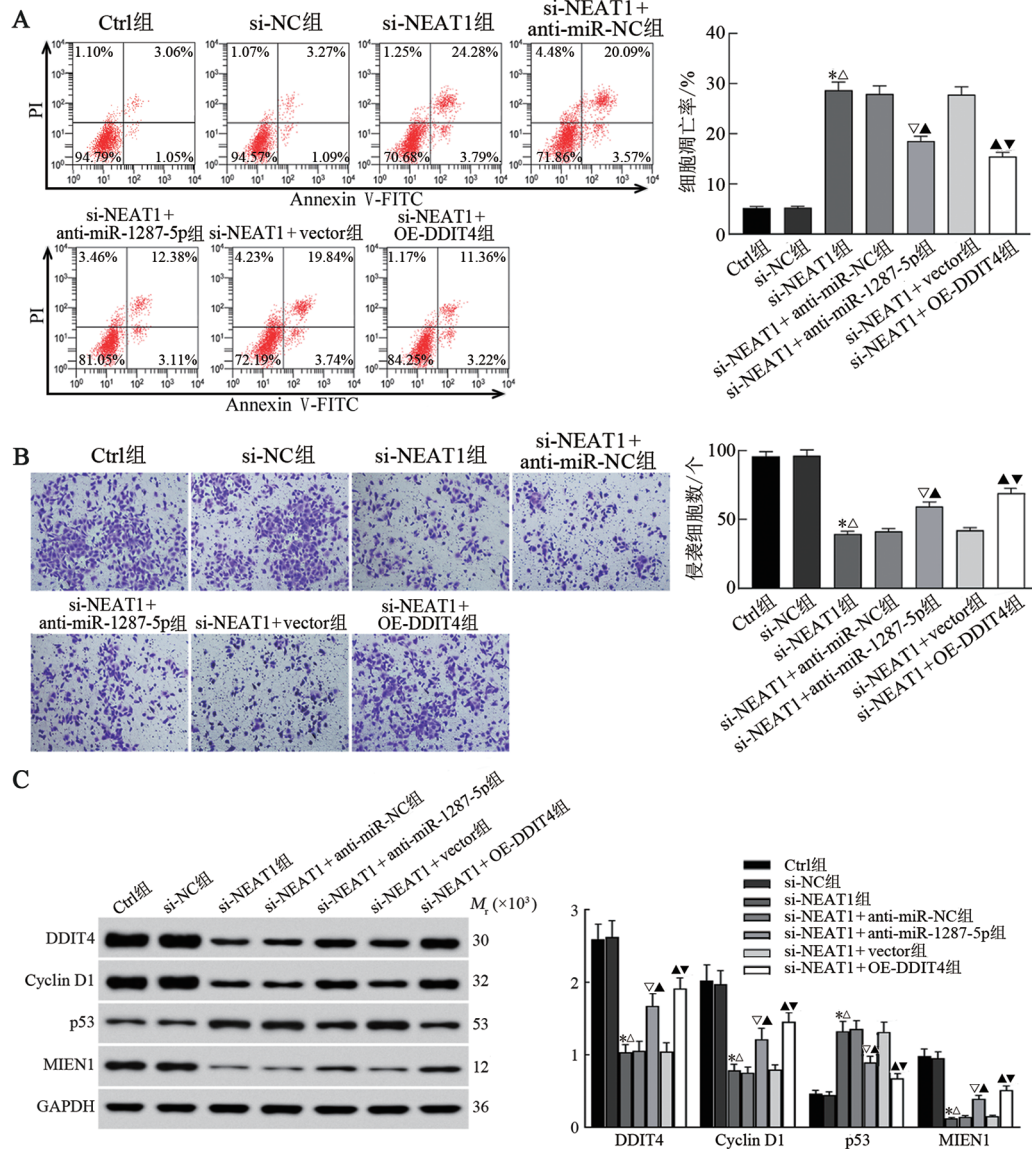
双萤光素酶报告基因实验验证显示, mimic NC + lncRNA NEAT1-WT 共转染组相比, miR-1287-5p mimic + lncRNA NEAT1-WT 共转染组的萤光素酶活性显著下降 (图 4B,  $P < 0.05$ ); 与 mimic NC + DDIT4-WT 共转染组相比, miR-1287-5p mimic + DDIT4-WT 共转染组的萤光素酶活性亦显著下降 (图 4C,  $P < 0.05$ )。结果提示, miR-1287-5p 可分别靶向 NEAT1 和 DDIT4。

RT-qPCR 法检测结果 (图 4D) 显示, 与 Ctrl 组和 pcDNA 组相比, pc-NEAT1 组 NEAT1 表达显著升高, miR-1287-5p 表达显著降低 (均  $P < 0.05$ )。

RNA pull-down 实验结果 (图 4E) 显示, bio-miR-1287-5p-WT 组 lncRNA NEAT1 的相对富集量显著高于 bio-miR-NC 组和 bio-miR-1287-5p-MUT 组 (均  $P < 0.05$ ), 富集效率达 87.5%, 而 bio-miR-NC 组及 bio-miR-1287-5p-MUT 组富集效率均低于 10%。结果表明, miR-1287-5p 可通过特异性靶向结合位点与 lncRNA NEAT1 相互作用, 突变结合位点后该相互作用

用消失,且 Input 对照校正后的数据排除了非特异性结合及上样量差异对结果的干扰,证实两者结合具

有特异性(图 4F)。以上实验结果表明,miR-1287-5p 可与 DDIT4 mRNA 相结合。



A: 流式细胞术检测各组 SKOV3 细胞凋亡水平; B: Transwell 实验检测各组 SKOV3 细胞侵袭能力(结晶紫染色, × 200); C: WB 法检测各组 SKOV3 细胞中 DDIT4、cyclin D1、p53 和 MIEN1 蛋白表达水平。与 Ctrl 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 si-NC 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 si-NEAT1 组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$ ; 与 si-NEAT1 + anti-miR-NC 组比较,  $\nabla P < 0.05$ ; 与 si-NEAT1 + vector 组比较,  $\blacktriangledown P < 0.05$ 。

图 3 抑制 lncRNA NEAT1 对各组 SKOV3 细胞凋亡、侵袭与 DDIT4、cyclin D1、p53 和 MIEN1 蛋白表达的影响

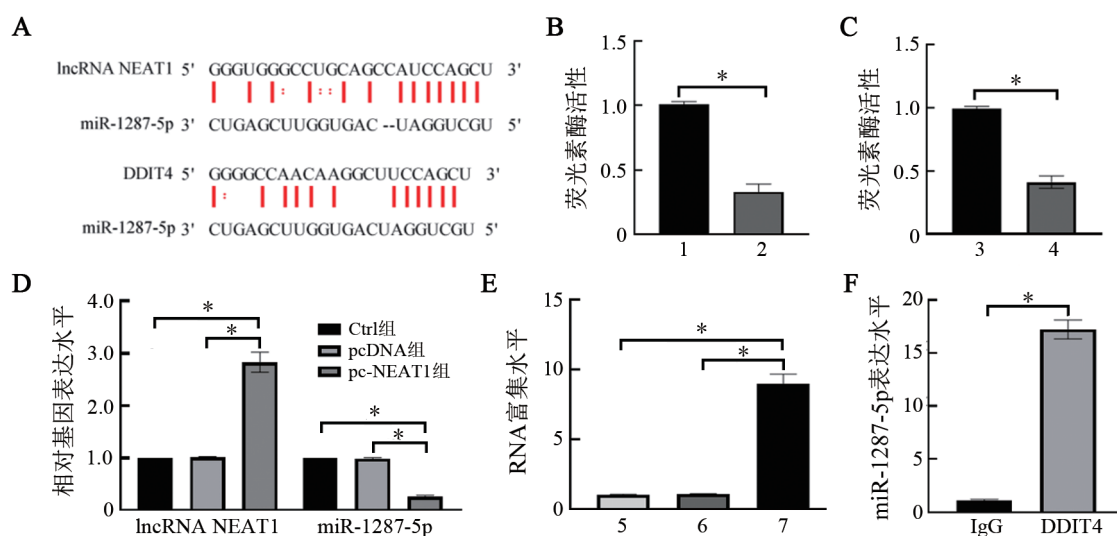
### 3 讨论

尽管卵巢癌的治疗取得了一定进展,但患者的总体预后仍然较差,主要归因于肿瘤转移及多药耐药的共同影响<sup>[8]</sup>。因此,深入探讨卵巢癌发生发展的分子机制,对于发现新的治疗靶点具有重要意义。lncRNA 能够调节多种生物过程,包括细胞增殖、分化和凋亡等<sup>[9]</sup>。lncRNA NEAT1 是位于人类染色体 11q13.1 上的基因,其失调与肿瘤进展密切相关<sup>[10-11]</sup>。已有研究显示,过表达 NEAT1 的卵巢癌细胞增殖与侵袭能力显著增强,细

胞凋亡减少<sup>[12]</sup>;敲减 NEAT1 抑制卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[13]</sup>。以上研究证实了 lncRNA NEAT1 在卵巢癌中的致癌作用。本研究结果显示,敲低 NEAT1 后,SKOV3 细胞的增殖活力、克隆形成数、细胞侵袭数均显著降低,细胞凋亡率显著升高,表明敲低 NEAT1 可抑制 SKOV3 细胞增殖、侵袭并诱导细胞凋亡。此外,cyclin D1 是细胞增殖标志物,其过表达可促进细胞周期进程和肿瘤生长<sup>[14]</sup>;p53 可通过诱导肿瘤细胞凋亡在多种肿瘤中发挥抑癌基因的作用<sup>[15]</sup>;MIEN1 具有促进癌细胞侵袭的特性<sup>[16]</sup>。本研究中,敲低 NEAT1 显著下调 SKOV3

细胞中 cyclin D1 和 MIEN1 表达, 上调 p53 表达, 进一步证实敲低 NEAT1 可抑制 SKOV3 细胞增殖与侵

袭并促进凋亡。提示 NEAT1 可能是治疗卵巢癌的潜在靶点之一, 但其具体的分子机制尚未明了。



1: mimic NC + lncRNA NEAT1-WT 组; 2: miR-1287-5p mimic + lncRNA NEAT1-WT 组; 3: mimic NC + DDIT4-WT 组; 4: miR-1287-5p mimic + DDIT4-WT 组; 5: bio-miR-NC 组; 6: bio-miR-1287-5p-MUT 组; 7: bio-miR-1287-5p-WT 组。  
 A: StarBase 网站预测 lncRNA NEAT1 与 miR-1287-5p、miR-1287-5p 与 DDIT4 的结合位点; B: 双萤光素酶报告基因实验验证 lncRNA NEAT1 与 miR-1287-5p 结合; C: 双萤光素酶报告基因实验验证 miR-1287-5p 与 DDIT4 结合; D: RT-qPCR 法检测细胞中 lncRNA NEAT1 与 miR-1287-5p 表达水平; E: RNA pull-down 实验验证 lncRNA NEAT1 与 miR-1287-5p 结合; F: RNA 免疫沉淀实验验证 miR-1287-5p 与 DDIT4 结合。\*P < 0.05。

图4 lncRNA NEAT1 与 miR-1287-5p 及 miR-1287-5p 与 DDIT4 mRNA 靶向结合关系的验证

lncRNA NEAT1 可通过调节 miRNA 表达影响肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭等行为<sup>[17]</sup>。本研究证实了 miR-1287-5p 为 lncRNA NEAT1 的下游靶基因。miR-1287-5p 在多种肿瘤中发挥肿瘤抑制功能, 如过表达 miR-1287-5p 可抑制非小细胞肺癌细胞的恶性表型<sup>[18]</sup>; 上调 miR-1287-5p 可抑制宫颈癌细胞增殖与侵袭<sup>[19]</sup>, 并抑制卵巢癌细胞增殖<sup>[6]</sup>。考虑到 miR-1287-5p 对卵巢癌细胞的恶性行为的影响已有研究, 故本研究未设置单独 miR-1287-5p 处理组。此外, 本研究发现, 抑制 lncRNA NEAT1 可上调 SKOV3 细胞中 miR-1287-5p 表达, 因此推测抑制 lncRNA NEAT1 可能通过上调 miR-1287-5p 抑制 SKOV3 细胞增殖、侵袭并诱导细胞凋亡。为验证该假设, 本研究在抑制 NEAT1 的基础上再用 anti-miR-1287-5p 干预 SKOV3 细胞, 结果显示, anti-miR-1287-5p 减弱了抑制 NEAT1 对 SKOV3 细胞增殖、侵袭的抑制作用, 以及对细胞凋亡的促进作用。证实了假设的合理性, 即敲低 lncRNA NEAT1 可能通过上调 miR-1287-5p 抑制 SKOV3 细胞增殖、侵袭并诱导细胞凋亡。

miRNA 可与 mRNA 的 3'-UTR 结合, 促进 mRNA 降解或抑制 mRNA 翻译并调节靶基因表达<sup>[20]</sup>。为进一步探究 lncRNA NEAT1/miR-1287-5p 轴影响 SKOV3 细胞生物学行为的分子机制, 本研究确定了 DDIT4 为 miR-

1287-5p 的靶基因。DDIT4 在多种癌组织中呈高表达, 并可调节细胞生长、增殖和细胞凋亡等过程<sup>[21]</sup>。DDIT4 在胃癌细胞和组织中上调, 在胃癌细胞中下调 DDIT4 可抑制细胞增殖<sup>[22]</sup>。本研究中, DDIT4 mRNA 及蛋白在卵巢癌组织及 SKOV3 细胞中均呈高表达, 敲低 NEAT1 后, SKOV3 细胞中 miR-1287-5p 表达上调, DDIT4 mRNA 及蛋白表达下调, 且 anti-miR-1287-5p 减弱了敲低 NEAT1 对 SKOV3 细胞中 DDIT4 mRNA 及蛋白表达的抑制作用, 以及对细胞生物学行为的影响。过表达 DDIT4 也逆转了抑制 NEAT1 对 SKOV3 细胞中 DDIT4 mRNA 及蛋白表达的抑制作用及对细胞生物学行为的影响。研究结果表明, 敲低 lncRNA NEAT1 可能通过调控 miR-1287-5p/DDIT4 轴抑制 SKOV3 细胞增殖、侵袭并诱导细胞凋亡。此外, 过表达 NEAT1 可下调 miR-1287-5p 并上调 DDIT4, 呈现与敲低实验相反的调控效应, 进一步证实 NEAT1 对 miR-1287-5p/DDIT4 轴的调控作用。

综上所述, 抑制 lncRNA NEAT1 可能通过调控 miR-1287-5p/DDIT4 抑制 SKOV3 细胞增殖、侵袭并促进凋亡。lncRNA NEAT1/miR-1287-5p/DDIT4 轴可能成为治疗卵巢癌的有效靶点之一。在筛选与 miR-1287-5p 相互作用的 lncRNA 时, NEAT1 被鉴定为卵巢癌组织中表达上调最明显的 lncRNA 之一。其他预测到的 lncRNA 是否也能调控 miR-1287-5p,

并产生相似或者相反的作用, 仍有待后续实验进一步验证。本实验设计的不足在于缺乏体内动物实验。虽然通过 RNA pull-down 实验和 RIP 实验初步证实了 lncRNA NEAT1 与 miR-1287-5p 的特异性结合, 以及 miR-1287-5p 与 DDIT4 的相互作用, 但尚未通过 Ago2-RIP 实验验证 lncRNA NEAT1、miR-1287-5p 与 DDIT4 mRNA 是否共同存在于同一 RISC 复合物, 亦缺乏 FISH 共定位实验在亚细胞水平展示其空间分布。后续将开展 Ago2-RIP 和双色 FISH 实验, 以完善 ceRNA 机制的功能性证据链。

**利益冲突声明:** 所有作者声明不存在利益冲突。

### [参考文献]

- [1] WANG J, ZHU Y, HE Y, et al. TAM-derived exosomal miR-589-3p accelerates ovarian cancer progression through BCL2L13s[J]. *J Ovarian Res*, 2025, 18(1):36-46. DOI: 10.1186/s13048-025-01618-1.
- [2] PONTI G, DE ANGELIS C, PONTI R, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: from genes to molecular targeted therapies[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2023, 60(8): 640-650. DOI: 10.1080/10408363.2023.2234488.
- [3] CHO JG, KIM SW, YUN E, et al. Dihydroartemisinin inhibits metastatic potential and cancer stemness by modulating the miR-200b-BMI-1/VEGF-A axis in ovarian cancer[J]. *Exp Mol Med*, 2025, 57(12):2782-2797. DOI: 10.1038/s12276-025-01582-2.
- [4] WANG G G, XU B Y, YU X L, et al. LINC01320 facilitates cell proliferation and migration of ovarian cancer via regulating PURB/DDB2/NEDD4L/TGF- $\beta$  axis[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 26233. DOI: 10.1038/s41598-024-78255-z.
- [5] MAO M Y, ZHENG X J, SHENG Y H, et al. Evodiamine inhibits malignant progression of ovarian cancer cells by regulating lncRNA-NEAT1/miR-152-3p/CDK19 axis[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2023, 102(1): 101-114. DOI:10.1111/cbdd.14228.
- [6] WANG H, ZHANG Y S, MIAO H X, et al. CircRAD23B promotes proliferation and carboplatin resistance in ovarian cancer cell lines and organoids[J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 42. DOI: 10.1186/s12935-024-03228-1.
- [7] SU J, ZHAO Y Q, CHEN W D, et al. Activation of the G protein-coupled bile acid receptor TGR5 modulates the HCP5/miR-139-5p/DDIT4 axis to antagonize cervical cancer progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(16): 8932. DOI:10.3390/ijms25168932.
- [8] 靖芳, 靖超, 金冬梅. 鞘磷脂合成酶 2 通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路调控卵巢癌 TOV-21G 细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(1): 32-39. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.01.005.
- [9] YAO C J, ZENG L J, LIU Q, et al. LncRNA FAM225B regulates PDIA4-mediated ovarian cancer cell invasion and migration via modulating transcription factor DDX17[J]. *Breast J*, 2023, 2023: 3970444. DOI:10.1155/2023/3970444.
- [10] LIANG J W, FANG F Q, GAO X Z, et al. LncRNA NEAT1 promotes proliferation, migration, and invasion of laryngeal squamous cell carcinoma cells through miR-411-3p/FZD3-mediated Wnt signaling pathway[J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 904. DOI:10.1186/s12885-024-12661-4.
- [11] LIU Y, XIN Z Y, ZHANG K, et al. LncRNA NEAT1 promotes angiogenesis of retinoblastoma cells through regulation of the miR-106a/HIF-1 $\alpha$  axis[J]. *Heliyon*, 2024, 10(6): e27653. DOI:10.1016/j.heliyon.2024.e27653.
- [12] LIU Y, LI Y, WU Y Z, et al. The long non-coding RNA NEAT1 promotes the progression of human ovarian cancer through targeting miR-214-3p and regulating angiogenesis[J]. *J Ovarian Res*, 2023, 16(1): 219. DOI:10.1186/s13048-023-01309-9.
- [13] YIN L L, WANG Y. Long non-coding RNA NEAT1 facilitates the growth, migration, and invasion of ovarian cancer cells *via* the let-7g/MEST/ATGL axis[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 437. DOI: 10.1186/s12935-021-02018-3.
- [14] YIN Y, WANG Z Y, HU Y J, et al. Caffeic acid hinders the proliferation and migration through inhibition of IL-6 mediated JAK-STAT-3 signaling axis in human prostate cancer[J]. *Oncol Res*, 2024, 32(12): 1881-1890. DOI:10.32604/or.2024.048007.
- [15] RUSIN M. The p53 protein - not only the guardian of the genome [J]. *Postepy Biochem*, 2024, 70(1): 71-87. DOI:10.18388/pb.2021\_518.
- [16] TRIPATHI A K, DESAI P P, TYAGI A, et al. Short peptides based on the conserved regions of MIEN1 protein exhibit anticancer activity by targeting the MIEN1 signaling pathway[J]. *J Biol Chem*, 2024, 300(3): 105680. DOI:10.1016/j.jbc.2024.105680.
- [17] NING N, TIAN Z Y, FENG H, et al. lncNEAT1 facilitates the progression of melanoma by targeting the miR-152-3p/CDK6 axis: an observational study[J]. *Medicine*, 2024, 103(44): e40379. DOI: 10.1097/MD.00000000000040379.
- [18] WU J Z, LIU C Y, YU G P. Downregulation of circ\_PLXND1 inhibits tumorigenesis of non-small cell lung carcinoma *via* miR-1287-5p/ERBB3 axis[J]. *Thorac Cancer*, 2023, 14(17): 1543-1555. DOI:10.1111/1759-7714.14897.
- [19] JI F, DU R, CHEN T F, et al. Circular RNA circSLC26A4 accelerates cervical cancer progression *via* miR-1287-5p/HOXA7 axis[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 413-420. DOI:10.1016/j.omtn.2019.11.032.
- [20] JIN M M, YUAN T L, TIAN K S, et al. Oncogenic circ-SLC16A1 promotes progression of non-small cell lung cancer *via* regulation of the miR-1287-5p/profilin 2 axis[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29(1): 43. DOI:10.1186/s11658-024-00549-x.
- [21] LI F M, MIAO J Y, LIU R, et al. Pan-cancer analysis of DDIT4 identifying its prognostic value and function in acute myeloid leukemia[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2024, 150(3): 144. DOI: 10.1007/s00432-024-05676-8.
- [22] DU F, SUN L N, CHU Y, et al. DDIT4 promotes gastric cancer proliferation and tumorigenesis through the p53 and MAPK pathways[J]. *Cancer Commun*, 2018, 38(1): 45. DOI: 10.1186/s40880-018-0315-y.

[收稿日期] 2025-03-06

[修回日期] 2026-02-24

[本文编辑] 党瑞山