

·基础研究·

上调NR2F1诱导卵巢癌细胞休眠并增强其对化疗药物的抵抗力

郭宁, 居颂文

(南京医科大学附属苏州医院/苏州市立医院中心实验室, 江苏 苏州 215002)

摘要:【目的】探讨NR2F1分子介导的休眠卵巢癌(OC)细胞对化疗药物耐药的分子机制。【方法】利用GEPIA数据库分析OC患者中NR2F1分子的表达及其与患者总生存期的关系;采用慢病毒体外转染构建核受体亚家族2组F1(NR2F1)过表达的OC细胞株和对照细胞;CCK-8试剂盒检测OC细胞的增殖;实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析OC细胞中休眠相关分子基因mRNA的表达水平;蛋白质免疫印迹试验分析相关分子蛋白表达水平;台盼蓝排除法分析不同化疗药物作用下OC细胞的活力;Annexin V-FITC/PI双染法流式细胞术检测不同化疗药物作用下OC细胞的凋亡程度;采用转录组测序技术对NR2F1过表达的SKOV3细胞株进行分析,通过KEGG富集分析,找出差异表达基因在相关信号通路中的富集程度;qRT-PCR验证OC细胞中耐药相关分子mRNA表达水平;GEPIA数据库作基因相关分析进一步验证NR2F1的表达与不同耐药相关基因表达的相关性。【结果】在OC患者中,原发肿瘤组织中的NR2F1分子以较低水平表达,而NR2F1高表达的OC患者总生存期的较短。与对照组相比,NR2F1过表达的OC细胞株增殖能力明显下降,表达更高水平的休眠相关分子细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白1B(p27)、分化型胚胎软骨基因-2(DEC2)、转化生长因子-β2(TGF-β2)和抗凋亡分子B淋巴细胞瘤-2基因(BCL-2),同时增殖相关分子肿瘤增殖抗原(KI67)表达下降。NR2F1过表达的OC细胞株对化疗药物的抵抗能力显著增强。转录组测序、KEGG富集分析结果显示,NR2F1介导的休眠OC细胞差异上调基因在磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B(PI3K-Akt)信号通路、黏着斑、细胞外基质-受体相互作用和调节干细胞多能性的信号通路中富集,差异下调基因富集在细胞周期等通路中。qRT-PCR验证结果显示,耐药相关分子驱动蛋白家族成员26B(KIF26B)、分泌性蛋白质酸性且富含半胱氨酸(SPARC)、胶原VI型α1链基因(COL6A1)、胶原V型α2链基因(COL5A2)、卷曲同源物1(FZD1)和抑制素β亚基A基因(INHBA)在NR2F1过表达的OC细胞中表达上调。GEPIA数据库基因相关分析结果显示,OC肿瘤组织中NR2F1的表达与耐药相关基因KIF26B、SPARC、COL6A1、COL5A2、FZD1和INHBA的表达与存在正相关关系。【结论】本研究表明,激活NR2F1信号通路可诱导OC细胞休眠,同时调节OC细胞耐药,NR2F1介导的休眠OC细胞的耐药机制可能涉及PI3K-Akt信号通路和调节干细胞多能性的信号通路,并且与这些通路相关分子中耐药相关分子KIF26B、SPARC、COL6A1、COL5A2、FZD1和INHBA表达水平的升高密切相关。

关键词: 休眠;核受体亚家族2组F1;卵巢癌;化疗药物;耐药

中图分类号:R737.31 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2025)05-0794-12

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2025.0509

Upregulation of NR2F1 Induces Dormancy in Ovarian Cancer Cells and Promotes Their Resistance to Chemotherapeutic Agents

GUO Ning, JU Songwen

(Central Laboratory, Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University/Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215002, China)

Correspondence to: JU Songwen; E-mail: jusongwen@aliyun.com

Abstract: 【Objective】 To explore the molecular mechanism of the chemo-resistance in NR2F1-mediated dormant

收稿日期:2025-06-19

录用日期:2025-08-15

基金项目:国家自然科学基金(81373149)

作者简介:郭宁,第一作者,研究方向:肿瘤免疫,E-mail:ningguo620@163.com;居颂文,通信作者,研究员,E-mail:jusongwen@aliyun.com

ovarian cancer(OC) cells.【Methods】The expression of the *NR2F1* molecule in OC patients and its relationship with the overall survival of patients were analyzed using the GEPIA database. Nuclear receptor subfamily 2 group F member 1 (*NR2F1*) overexpressed OC cell and control cell were constructed by lentivirus in vitro transfection. The proliferation of OC cells was analyzed by CCK-8 method. Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) was used to analyze the mRNA expression of dormancy-related molecular genes in OC cells. Western blot was performed to analyze the protein expression levels of related molecules. The viability of OC cells treated with different chemotherapy drugs was analyzed by trypan blue exclusion method. Annexin V-FITC/PI double-staining assay was used to detect the apoptosis of OC cells treated by different chemotherapy drugs. Transcriptome sequencing technology was used to analyze the differentially expressed genes in *NR2F1* overexpressed SKOV3 cell line, and the relevant signaling pathways were screened through KEGG enrichment analysis. qRT-PCR was performed to verified the mRNA expression level of drug resistance-related molecules in OC cells. The GEPIA database was used to further verify the correlation between the expression of *NR2F1* and the drug resistance-related genes.【Results】The *NR2F1* expression is low in the tumor tissues and the high expression of *NR2F1* correlates with poor overall survival in the OC patients. Compared with the control group, the proliferation ability of the *NR2F1* overexpressed OC cell lines was significantly reduced. The expression of dormancy-related molecules, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B(*p27*), differentiated embryonic cartilage gene-2(*DEC2*) and transforming growth factor- β 2 (*TGF- β 2*), increased significantly in the *NR2F1* overexpressed OC cell lines, and anti-apoptotic molecule B-cell lymphoma gene-2 (*BCL-2*) also increased. In contrast, the expression of the proliferation-related molecule *KI67* was decreased. In addition, the *NR2F1* overexpressed OC cell lines significantly enhanced the resistance to chemotherapy drugs. Transcriptome sequencing and KEGG enrichment analysis showed that the upregulated genes in *NR2F1* overexpressed OC cells were enriched in phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase (PI3K-Akt) signaling pathway, focal adhesion pathway, extracellular matrix-receptor interactions and signaling pathways regulating pluripotency of stem cells, and the downregulated genes in *NR2F1* overexpressed OC cells were mainly enriched in cell cycle pathway. The results of qRT-PCR verification showed that drug resistance-related molecules kinesin family member 26B (*KIF26B*), secreted protein acidic and rich in cysteine (*SPARC*), collagen type VI alpha 1 (*COL6A1*), collagen type V alpha 2 chain (*COL5A2*), frizzled homolog 1 (*FZD1*) and inhibin subunit beta A gene (*INHBA*) were up-regulated in *NR2F1* overexpressed OC cells. GEPIA database analysis showed that the expression of *NR2F1* in OC tumor tissues was positively correlated with the expression of drug resistance-related genes *KIF26B*, *SPARC*, *COL6A1*, *COL5A2*, *FZD1* and *INHBA*.【Conclusions】This study shows that upregulation of *NR2F1* may induce dormancy in OC cells and enhance their resistance to chemo-drugs. The *NR2F1*-mediated drug resistance of dormant OC cells might be associated with the PI3K-Akt signaling pathway and signaling pathways regulating pluripotency of stem cells, and closely related to the upregulation of *KIF26B*, *SPARC*, *COL6A1*, *COL5A2*, *FZD1* and *INHBA*.

Key words: dormancy; nuclear receptor subfamily 2 group F member 1; ovarian cancer; chemotherapeutic agents; drug resistance

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2025, 46(5): 794-805]

卵巢癌(ovarian cancer, OC)是女性生殖器官常见的肿瘤之一,虽然卵巢癌的发病率次于宫颈癌和子宫内膜癌,列于世界上第三大常见妇科恶性肿瘤,但其致死率却占各类妇科肿瘤的首位^[1-2]。其中卵巢上皮性癌(epithelial ovarian cancer, EOC)较为常见,EOC在卵巢恶性肿瘤中的占比约达到90%^[3]。导致高发病率和致死率的主要原因之一是卵巢癌早期临床表现有限,约75%的患者确诊时已处于晚期,肿瘤已扩散到腹腔腔和上腹部器

官^[4]。尽管采取最佳手术和适当的化疗,仍有70%~80%的EOC患者会出现疾病复发。新近的研究表明,休眠肿瘤细胞是导致肿瘤复发转移的根源之一,从原发肿瘤检测到转移复发之间的时期通常被定义为肿瘤休眠,肿瘤休眠标志着肿瘤发展处于关键阶段,其中肿瘤细胞持续存在,但临床上观察到的肿瘤进展并不明显^[5]。肿瘤细胞在受到威胁时(例如化疗),会进入一种缓慢分裂的“休眠状态”,休眠肿瘤细胞能够在低氧和缺乏营养等恶劣

条件下存活,并具有较强的对化疗药物的耐药性,以逃避化疗药物和靶向药物的杀伤作用^[5-6]。研究指出具有休眠特征的非增殖性OC细胞群可能是肿瘤扩散和治疗耐药的来源,休眠表型的诱导能够保护OC细胞免受化疗的损伤^[7]。调控肿瘤细胞休眠的相关分子机制目前已报道多种,其中,核受体亚家族2组F1(nuclear receptor subfamily 2 group F member 1, NR2F1)是一种类固醇/甲状腺激素受体超家族的孤儿核受体,又称为核受体相关转录因子1(coup transcription factor 1, COUP-TF1),这种受体蛋白能进入到细胞核中并开启或关闭多种基因的表达,从而激活一种能防止癌细胞增殖的程序,上调NR2F1能够特异性激活肿瘤细胞的休眠程序^[8]。NR2F1调控肿瘤休眠的作用已在多个癌种间报道,其中包括NR2F1在乳腺癌细胞休眠信号传导中起关键作用,调节NR2F1分子能够诱导乳腺癌肺转移休眠;NR2F1能够促进唾液腺样囊性癌细胞的休眠、侵袭和转移;此外,还有研究指出激活NR2F1能够特异性激活头颈部鳞状细胞癌的休眠程序^[9-11]。然而,现有的研究并未明确NR2F1分子对OC肿瘤细胞的休眠调控作用,其对OC细胞耐药的调控机制也仍不清楚。本文旨在探讨NR2F1分子对卵巢癌细胞休眠的调控作用,及其对卵巢癌细胞耐药的调控作用和相关分子机制进行初步的探讨。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材 料 人卵巢癌细胞株SKOV3和OVCAR3购自中国科学院细胞库;pSLenti-CMV-MCS-3xFLAG-PGK-Puro-WPRE和pSLenti-CMV-NR2F1-3xFLAG-PGK-Puro-WPRE载体购自中国和元生物。

1.1.2 试 剂 RPMI-1640培养基购自美国Corning;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自澳大利亚Sigma-aldrich;青霉素-链霉素-L-谷氨酰胺、DMSO、胰蛋白酶细胞消化液(含2.5 g/L胰蛋白酶)、台盼蓝染色细胞存活率检测试剂盒、RIPA细胞裂解液、Bradford蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5×)、BeyoColor™彩色预染蛋白分子量标准、SDS-PAGE电泳液(Tris-Gly, Powder)、Western

快速转膜液、Quick Block™ Western封闭液、Western一抗稀释液、TBSTw(10×)、HRP标记山羊抗兔IgG(H+L)、特超敏ECL化学发光试剂盒、5-氟尿嘧啶(5-Fu)、顺铂(Cisplatin)、增强型CCK-8溶液均购于中国Beyotime;蛋白酶抑制剂(cOmplete, Mini, EDTA-free)购于瑞士Roche;Rabbit anti-GAPDH mAb、Rabbit anti-NR2F1 mAb、Rabbit anti-p27 mAb、Rabbit anti-BCL-2 mAb购于美国CST;Rabbit anti-KI67 mAb购于英国Abcam、紫杉醇(Paclitaxel)购于美国Abmole;Trizol RNA提取试剂购于美国Thermo Fisher Scientific;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒、逆转录试剂盒HiScript III RT SuperMix(+gDNA wiper)、SYBR Green Master Mix购自中国Vazyme。

1.1.3 仪 器 实时荧光定量PCR仪(德国Analytik-Jena);微孔板分光光度仪(美国BioTek Epoch);流式细胞仪(美国BD Calibur);化学发光/荧光成像仪(德国Analytik-Jena);CO₂培养箱(新加坡ESCO);低温高速离心机(德国SIGMA);可调式混匀仪(中国Scilogex);生物安全柜(中国苏净安泰);显微镜(德国Leica)。

1.2 构建稳转细胞株

将SKOV3和OVCAR3细胞株接种到12孔板中,第二天用含有6 μg/mL Polybrene的1 mL新鲜完全培养基替换原培养基,根据感染复数MOI(Multiplicity of infection)分别加入适量慢病毒病毒悬液(pSLenti-CMV-NR2F1-3xFLAG-PGK-Puro-WPRE)和对照病毒(pSLenti-CMV-MCS-3xFLAG-PGK-Puro-WPRE),37 °C孵育48 h,更换新鲜培养基,加入8 μg/mL工作浓度的嘌呤霉素(Puromycin),37 °C培养48 h,去除Puromycin,筛选出稳定表达NR2F1的细胞株:SKOV3-CMV-NR2F1, OVCAR3-CMV-NR2F1, 对照细胞:SKOV3-CMV-CON, OVCAR3-CMV-CON。

1.3 细胞增殖能力测定

采用CCK-8法测定OC细胞增殖能力。将NR2F1过表达的SKOV3和OVCAR3和细胞与对照细胞同时接种到96孔板中,细胞接种量约每孔1×10⁴个/100 μL,向待测孔四周加入100 μL左右PBS,减少蒸发;在接种后的不同时间点,向每个孔中加入10 μL CCK-8溶液,37 °C下孵育1 h后,使用微孔板分光光度仪检测450 nm处的吸光值(OD值),通过OD值来判断活细胞数量和活细胞增殖能力,OD

值越大,细胞活性越强。

1.4 实时荧光定量PCR

使用Trizol试剂提取总RNA,加入20 μ L DEPC水溶解获得总RNA。获得总RNA后,采用逆转录试剂盒 HiScript III RT SuperMix (+gDNA wiper)对

总RNA进行逆转录获得cDNA,使用SYBR Green Master Mix 参照试剂盒说明书配制实时荧光定量PCR (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)反应体系后进行实时定量聚合酶链反应测定。所用引物序列见于表1。

表1 qRT-PCR引物序列
Table1 Primers used in qRT-PCR

Gene human	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>NR2F1</i>	GACCACATCCGCATCTTCCAG	GCTCCTCACGTACTCTCCAG
<i>p27</i>	CAAGAGGTGGAGAAGGGCAG	AAGAATCGTCGGTTGCAGGT
<i>DEC2</i>	CTCAGCTGAAAGATTTACTGCC	AGGCGGTTAAAGCTTTTAAGTG
<i>TGF-β2</i>	ACTTTCTACAGACCCTACTT	GCCATCAATACCTGCAAATC
<i>KI67</i>	ACGCCCTGGTTACTATCAAAAGG	CAGACCCATTTACTTGTGTGGGA
<i>BCL-2</i>	CGCCCCTGGTGGACAACATC	GCATCCCAGCCTCCGTTATCC
<i>KIF26B</i>	GCGTCGGTGGAACTTTAGA	TCACCCCGTATTTCTTGCCC
<i>FZD1</i>	TACAGCACGCTGAAGACGCCAA	CACTGACCAAATGCCAATCC
<i>COL5A2</i>	CCGGGTCTAGCTGGTAAAAG	TCTCCTCTAGGTCCTAACGGG
<i>SPARC</i>	CGAAGAGGAGGTGGTGGCGGAAA	GGTTGTTGTCCTCATCCCTCTCATAC
<i>COL6A1</i>	TCAAGAGCCTGCAGTGGAT	TGGACACTTCTGTCTATGC AG
<i>INHBA</i>	AAGTCGGGGAGAACGGGTATG	TCTTCCTGGCTGTTCTGAC
β -actin	TCACCCTGAAGTACCCCATC	ATAGCACAGCCTGGATAGCA

1.5 蛋白质免疫印迹试验

预冷的PBS洗涤细胞3次后,向每个细胞培养孔中加入500 μ L配有蛋白抑制剂的RIPA细胞裂解液,冰上反应20 min,收集裂解产物至EP管中,在14 000 $\times g$ 的转速下4 $^{\circ}$ C离心30 min,将蛋白上清液转移至新的EP管,弃去沉淀。用去离子水提前配置好适当体积的1 \times 电泳液、1 \times 转膜液、1 \times TBST和1 \times TBST配置的50 g/L脱脂奶粉。Bradford法测定蛋白浓度后,将蛋白上样缓冲液(5 \times)按比例与20 μ g蛋白样品混匀,100 $^{\circ}$ C金属浴5 min,置于冰上冷却后将样品加入点样孔。先恒压80V-SDS-PAGE电泳30 min,后采用120 V恒压完成跑胶。转膜装置在冰浴条件下,调恒流400 mA,转膜20~25 min,分子量大的蛋白质适当增加转膜时间。用封闭液将转膜完成的NC膜在室温下封闭30 min;将NC膜放入按照适当比例稀释过的一抗中,GAPDH(1:1 000),KI67(1:1 000),BCL-2(1:1 000),置于摇床4 $^{\circ}$ C孵育过夜。用5%脱脂奶粉按照1:1 000稀释二抗,将NC膜放入稀释过的二抗中,置于摇床

室温孵育40 min。按照试剂盒说明书配制ECL显色液,化学发光成像系统显色后保存条带图像。

1.6 细胞活力测定

使用台盼蓝排除测定法分析细胞活力。将处于对数生长期的*NR2F1*过表达SKOV3和OVCAR3和细胞株与对照细胞株分别接种到96孔板中,细胞活力都在98%以上,细胞接种量约每孔 2×10^4 个/100 μ L。设置不同的处理组:5-Fu(20 μ g/mL)、紫杉醇(5 μ mol/L)、顺铂(10 μ mol/L)。分别在24 h、48 h、72 h等时间点进行台盼蓝染色,消化离心收集细胞重悬液,根据试剂盒说明书取适量细胞悬液和台盼蓝染色液(2 \times)按照1:1比例轻轻混匀,染色3~5 min。计数:使用血细胞计数板对染色细胞进行计数。每个细胞样品至少数500个细胞更为精确,计数细胞总数和染色蓝色细胞数。细胞存活率=(细胞总数-蓝色细胞数)/细胞总数 \times 100%。

1.7 细胞凋亡测定

Annexin V-FITC/PI双染法检测化疗药物诱导卵巢癌细胞凋亡。将处于对数生长期的*NR2F1*过

表达SKOV3和OVCAR3细胞株与对照细胞株分别接种到24孔板中,细胞接种量约 2×10^5 个/孔;化疗药物处理:每种细胞均设置溶剂对照(DMSO),药物处理组分别加入5-Fu(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、紫杉醇(5 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、顺铂(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育48 h;消化细胞,将细胞重悬液收集于流式管中,1 800 $\times g$ 离心5 min,弃上清,PBS洗涤细胞两次;根据细胞凋亡检测试剂盒说明书,每管加入100 μL 1 \times binding buffer重悬细胞,再加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI staining solution,混匀,室温避光孵育10 min,最后每管加入400 μL 1 \times binding buffer,混匀;流式细胞仪检测凋亡细胞,凋亡细胞被Annexin V-FITC染成绿色荧光,同时具备Annexin V-FITC的绿色荧光和PI的红色荧光的是坏死细胞或处于凋亡晚期的细胞。使用Flowjo软件分析数据。

1.8 高通量测序和通路富集分析

对NR2F1过表达的SKOV3细胞株和对照组细胞株进行转录组水平测序,测序结果通过京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析从大量基因数据库中识别出差异基因在生物代谢或信号通路中的显著性聚集,揭示其参与的生物学过程、功能机制等。差异表达基因富集分析得出的 P 进行多重假设检验校正,通过控制FDR(false discovery rate)来决定 P 的阈值,校正后的 P 即 q , $q < 0.05$ 的通路提示具有统计学意义。

1.9 GEPIA数据库

GEPIA数据库是基于TCGA肿瘤样本和GTEx正常样本的RNA-seq数据在线基因表达分析工具,包含基因表达差异分析、生存分析、相关性分析等功能。利用GEPIA数据库分析OC患者中NR2F1分子的表达及其与患者总生存期的关系;利用GEPIA数据库对差异表达基因进行进一步验证,根据研究内容选定肿瘤类型为卵巢癌,将NR2F1分子分别与前文研究筛选出的差异表达基因作相关分析,相关程度用皮尔逊相关系数(Pearson correlation coefficient)来评估。

1.10 统计分析

用SPSS 25.0软件进行统计分析。数据包含3次独立的重复实验,符合正态分布及方差齐的资料以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,两组间比较使用 t 检验,细胞增殖和细胞活力的统计学显著性使用单因素重复测量方差分析(ANOVA)。* $P <$

0.05、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 、**** $P < 0.0001$ 提示差异具有统计学意义。ns代表 $P > 0.05$,差异无统计学意义。

2 结果

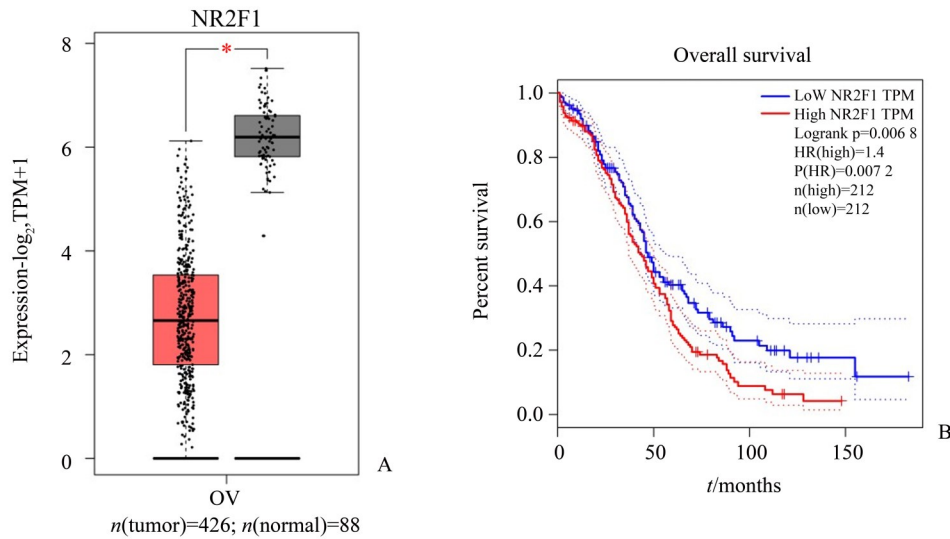
2.1 NR2F1分子的表达与卵巢癌患者总生存期分析

GEPIA数据库分析NR2F1分子表达及其与卵巢癌患者总生存期的关系,结果显示,与正常组织相比,原发OC肿瘤组织中NR2F1的表达较低($P < 0.05$;图1A),而OC肿瘤组织中NR2F1分子高表达的患者总生存期较短(HR=1.4, $P=0.0068$;图1B)。

2.2 NR2F1分子过表达诱导卵巢癌细胞株休眠

检测NR2F1过表达的卵巢癌SKOV3和OVCAR3细胞株与对照细胞株的增殖情况,重复测量方差分析结果显示,NR2F1过表达OC细胞增殖能力较对照组明显降低(SKOV3: $F=225.812$, $P < 0.0001$; OVCAR3: $F=26.762$, $P=0.0021$;图2A)。进一步采用qRT-PCR法检测结果显示,肿瘤细胞休眠相关分子细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白1B(cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, p27)、分化型胚胎软骨基因-2(differentiated embryonic cartilage gene-2, DEC2)和转化生长因子- β 2(transforming growth factor- β 2, TGF- β 2)在NR2F1过表达的OC细胞株中表达明显上调(SKOV3, p27: $t=3.837$, $P=0.0185$, DEC2: $t=8.563$, $P=0.0011$, TGF- β 2: $t=4.464$, $P=0.0111$; OVCAR3, p27: $t=8.215$, $P=0.0012$, DEC2: $t=14.234$, $P=0.0001$, TGF- β 2: $t=4.603$, $P=0.01$),抗凋亡分子B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma gene-2, BCL-2)在NR2F1过表达的OC细胞株中的表达升高(SKOV3: $t=6.196$, $P=0.0035$; OVCAR3: $t=14.837$, $P=0.0001$),而增殖标志分子肿瘤增殖抗原(proliferation-related molecule antigen KI67, KI67)表达明显下降(SKOV3: $t=4.122$, $P=0.0146$; OVCAR3: $t=3.646$, $P=0.0219$;图2B)。

蛋白质免疫印迹试验(Western blot)验证OC细胞株中慢病毒转染NR2F1分子的效率(SKOV3: $t=6.515$, $P=0.0029$; OVCAR3: $t=8.896$, $P=0.0009$),此外,Western blot实验结果显示NR2F1过表达的OC细胞株休眠标志分子p27蛋白表达升高(SKOV3: $t=$



A: The expression of *NR2F1* was low in primary OC tumor tissues. B: Patients with high expression of *NR2F1* molecule in OC tumor tissues had a shorter overall survival. * $P < 0.05$.

图1 卵巢癌肿瘤组织内*NR2F1*分子表达以及与卵巢癌患者生存期的分析

Fig. 1 The expression of *NR2F1* in ovarian cancer tissues and the correlation between *NR2F1* expression and the overall survival in ovarian cancer patients

6.417, $P=0.003$; OVCAR3: $t=16.79$, $P<0.0001$), 增殖标志分子KI67蛋白表达下降(SKOV3: $t=11.02$, $P=0.0004$; OVCAR3: $t=10.59$, $P=0.0005$), 抗凋亡分子BCL-2蛋白表达升高(SKOV3: $t=5.086$, $P=0.007$; OVCAR3: $t=14.94$, $P=0.0001$; 图2C)。

2.3 *NR2F1*过表达的卵巢癌细胞株抵抗化疗药物的能力增强

台盼蓝排除法连续监测细胞活力,重复测量方差分析结果显示,*NR2F1*过表达的细胞株存活率明显高于对照组(SKOV3, 5-Fu: $F=25.501$, $P=0.001$, 紫杉醇: $F=42.275$, $P=0.0002$, 顺铂: $F=21.86$, $P=0.0016$; OVCAR3, 5-Fu: $F=18.176$, $P=0.0027$, 紫杉醇: $F=36.374$, $P=0.0003$, 顺铂: $F=21.366$, $P=0.0017$; 图3A)。这表明*NR2F1*介导的休眠OC细胞对多种化疗药物具有更强的抵抗能力。

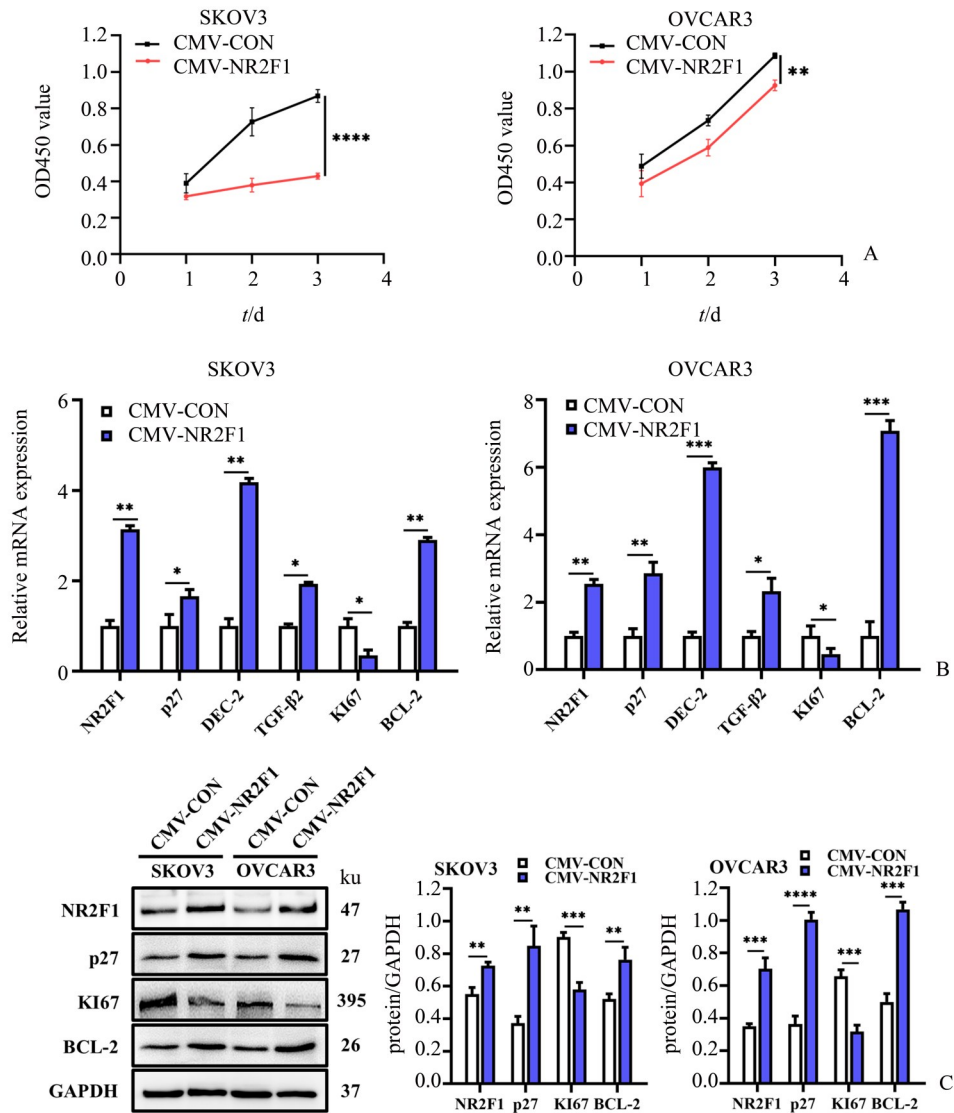
流式分析结果显示,*NR2F1*过表达的SKOV3和OVCAR3细胞组凋亡细胞(Annexin V阳性细胞)的占比相较对照组细胞均显著降低(SKOV3, 5-Fu: $t=5.933$, $P=0.004$, 紫杉醇: $t=6.673$, $P=0.0026$, 顺铂: $t=8.530$, $P=0.0034$; OVCAR3, 5-Fu: $t=4.087$, $P=0.015$, 紫杉醇: $t=10.960$, $P=0.0004$, 顺铂: $t=10.910$, $P=0.0004$; 图3B)。这些结果也证实,*NR2F1*诱导的休眠OC细胞对化疗药物诱导凋亡的抵抗能力显著增强。

2.4 KEGG富集分析

KEGG通路富集分析表明,差异上调蛋白的基因在磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B(phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase, PI3K-Akt)信号通路、细胞外基质-受体相互作用(extracellular matrix-receptor interactions)、黏着斑(focal adhesion, FA)、调节干细胞多能性信号通路(signaling pathways regulating pluripotency of stem cells)、蛋白质消化和吸收(protein digestion and absorption)、氮代谢(nitrogen metabolism)通路中富集(图4A)。差异下调蛋白的基因富集到细胞周期(cell cycle)、角质化包膜形成(cornified envelope formation)等通路中(图4B)。

2.5 *NR2F1*分子的表达与耐药相关分子表达相关

qRT-PCR验证关键信号通路中耐药相关分子在*NR2F1*过表达的OC细胞株中的表达,结果显示,*PI3K-Akt*通路相关分子中与耐药相关的分子驱动蛋白家族成员26B(kinesin family member 26B, *KIF26B*),分泌性蛋白质酸性且富含半胱氨酸(secreted protein acidic and rich in cysteine, *SPARC*)、胶原VI型 $\alpha 1$ 链基因(collagen type VI alpha 1, *COL6A1*)、胶原V型 $\alpha 2$ 链基因(collagen type V alpha 2 chain, *COL5A2*),以及调节干细胞多能性的信号通路中与耐药相关的分子卷曲同源物



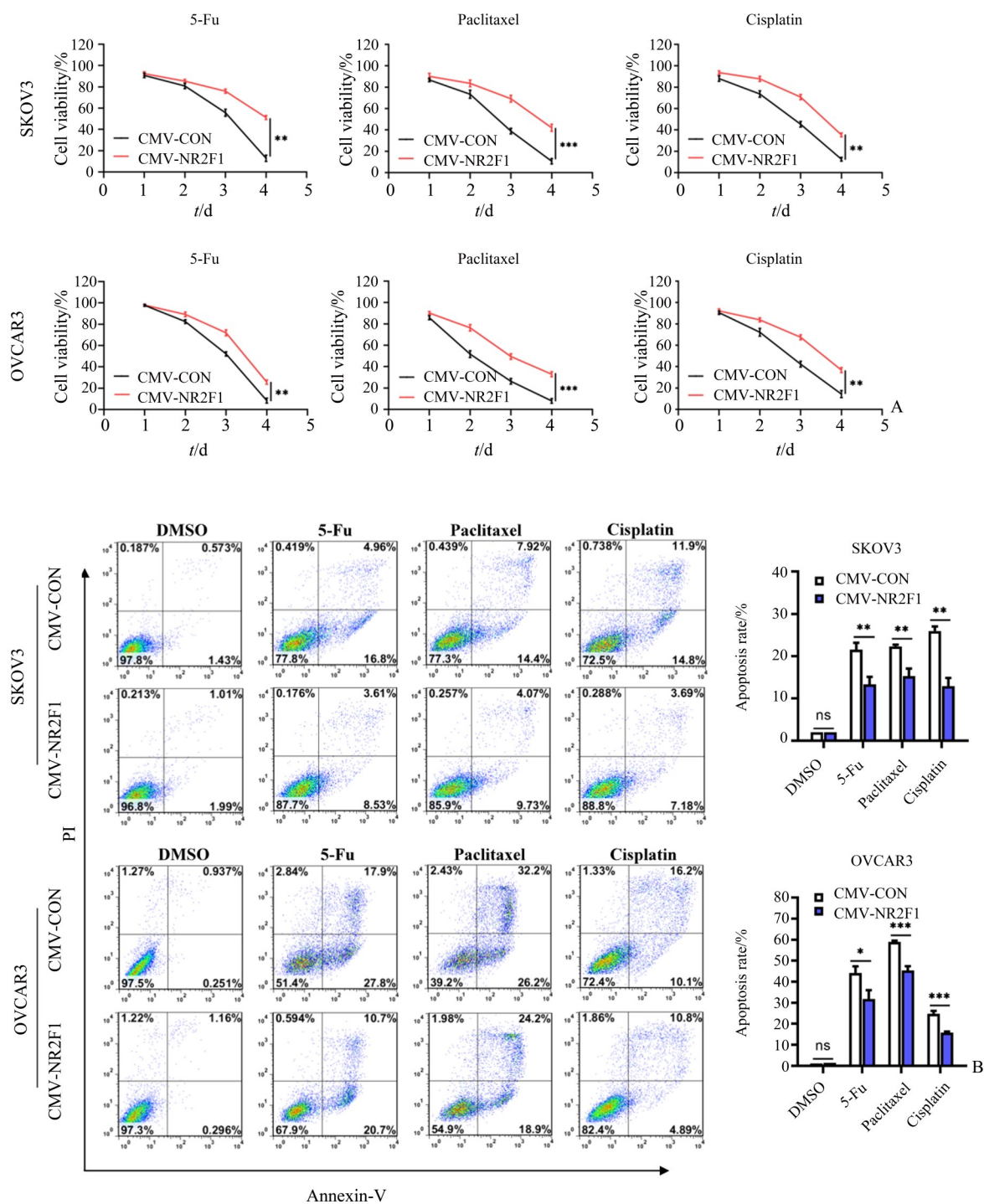
A: The OD values of *NR2F1* overexpressed SKOV3 and OVCAR3 cells and control cells were measured by CCK-8 assay at 24 h, 48 h and 72 h after inoculation. $n=3$, $** P < 0.01$, $**** P < 0.0001$. B: The mRNA expression of *NR2F1*, *p27*, *DEC2*, *TGF-β2*, *KI67* and *BCL-2* in the ovarian cancer cell of each group were assessed by qRT-PCR analysis. $n=3$, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$. C: The protein expression of *NR2F1*, *p27*, *KI67*, *BCL-2* in the ovarian cancer cell of each group were assessed by Western blot. $n=3$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$, $**** P < 0.0001$.

图2 *NR2F1* 过表达诱导卵巢癌细胞休眠

Fig. 2 Overexpression of *NR2F1* induces dormancy in ovarian cancer cells

1 (frizzled homolog 1, *FZD1*)和抑制素β亚基A基因 (inhibin subunit beta A gene, *INHBA*) mRNA 表达均明显上调 (SKOV3, *KIF26B*: $t=12.518$, $P=0.0002$, *SPARC*: $t=6.973$, $P=0.0022$, *COL6A1*: $t=7.927$, $P=0.0014$, *COL5A2*: $t=10.461$, $P=0.0005$, *FZD1*: $t=7.421$, $P=0.0018$, *INHBA*: $t=8.152$, $P=0.0012$; OVCAR3, *KIF26B*: $t=18.03$, $P<0.0001$, *SPARC*: $t=13.084$, $P=0.0002$, *COL6A1*: $t=7.295$, $P=0.0019$, *COL5A2*: $t=7.85$, $P=0.0014$, *FZD1*: $t=9.955$, $P=0.0006$, *INHBA*: $t=7.891$, $P=0.0014$;图5A)。

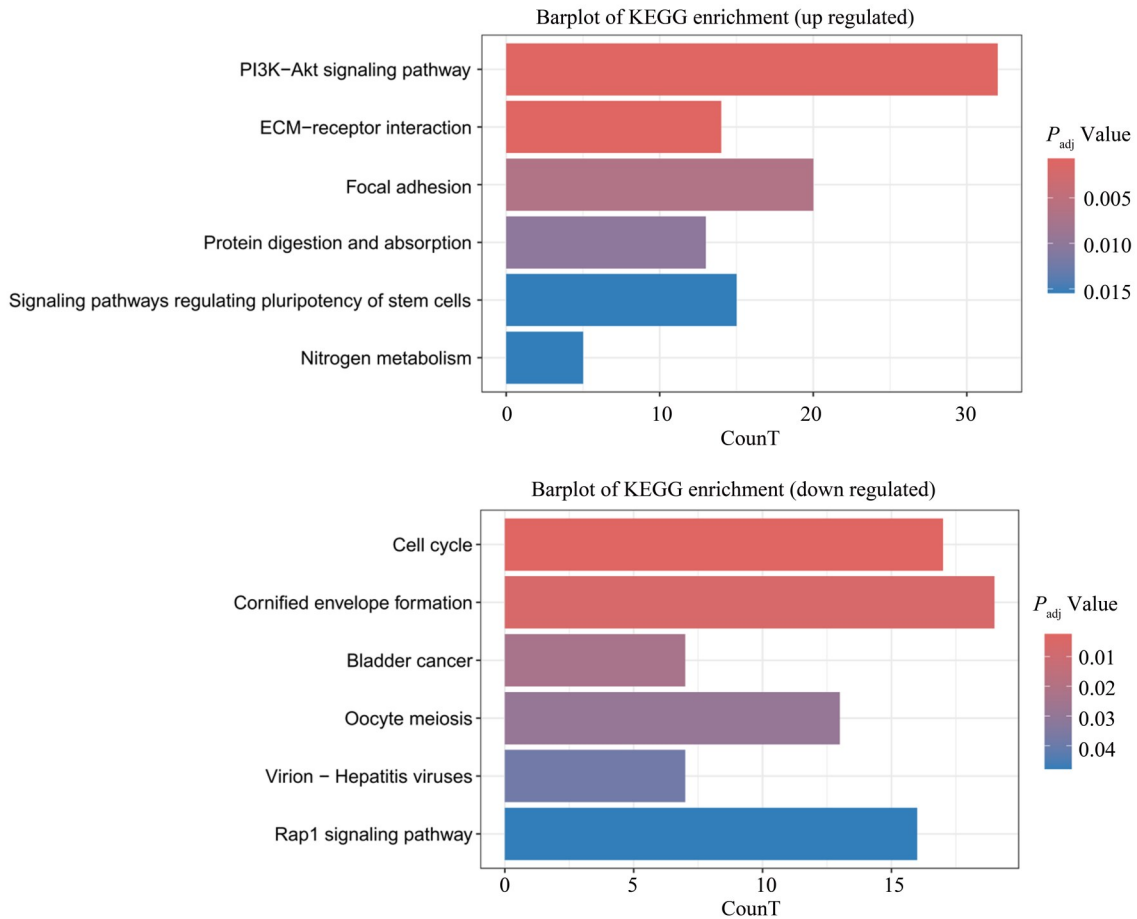
GEPIA数据库基因相关分析结果显示,在OC肿瘤组织中 *NR2F1* 的表达与耐药相关基因 *KIF26B*, *SPARC*, *COL6A1*, *COL5A2*, *FZD1* 和 *INHBA* 的表达存在正相关关系 (*KIF26B*: $R=0.38$, $P=4.4 \times 10^{-16}$; *SPARC*: $R=0.27$, $P=1.4 \times 10^{-8}$; *COL6A1*: $R=0.3$, $P=3.9 \times 10^{-10}$; *COL5A2*: $R=0.27$, $P=9.9 \times 10^{-9}$; *FZD1*: $R=0.44$, $P=0$; *INHBA*: $R=0.21$, $P=1.8 \times 10^{-5}$;图5B),这些结果进一步验证了上调 *NR2F1* 的表达可提高这些分子的表达。



A: *NR2F1* overexpressed SKOV3 and OVCAR3 cells and control cells were cultured with 5-Fu (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), paclitaxel (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$), cisplatin (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$), respectively, and the viability of *NR2F1*-overexpressing ovarian cancer cells was analyzed by trypan blue exclusion assay. $n=5$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. B: *NR2F1* overexpressed SKOV3 and OVCAR3 cell lines were treated with 5-Fu (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), paclitaxel (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$), cisplatin (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) or solvent control DMSO for 48 h, and the apoptotic cells was analyzed by Annexin V-FITC/PI dual-labeled assay. $n=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and ns=not significant.

图3 上调NR2F1表达诱导的休眠卵巢癌细胞对化疗药物抵抗力增强

Fig. 3 Upregulation of *NR2F1* induces increased resistance of dormant ovarian cancer cells to chemotherapeutic drugs



KEGG pathway enrichment analysis shows PI3K-Akt signaling pathway, focal adhesion pathway, extracellular matrix-receptor interactions and signaling pathways regulating pluripotency of stem cells were activated in *NR2F1* overexpressed OC cells.

图4 *NR2F1* 介导的休眠卵巢癌细胞差异基因 KEGG 通路富集分析

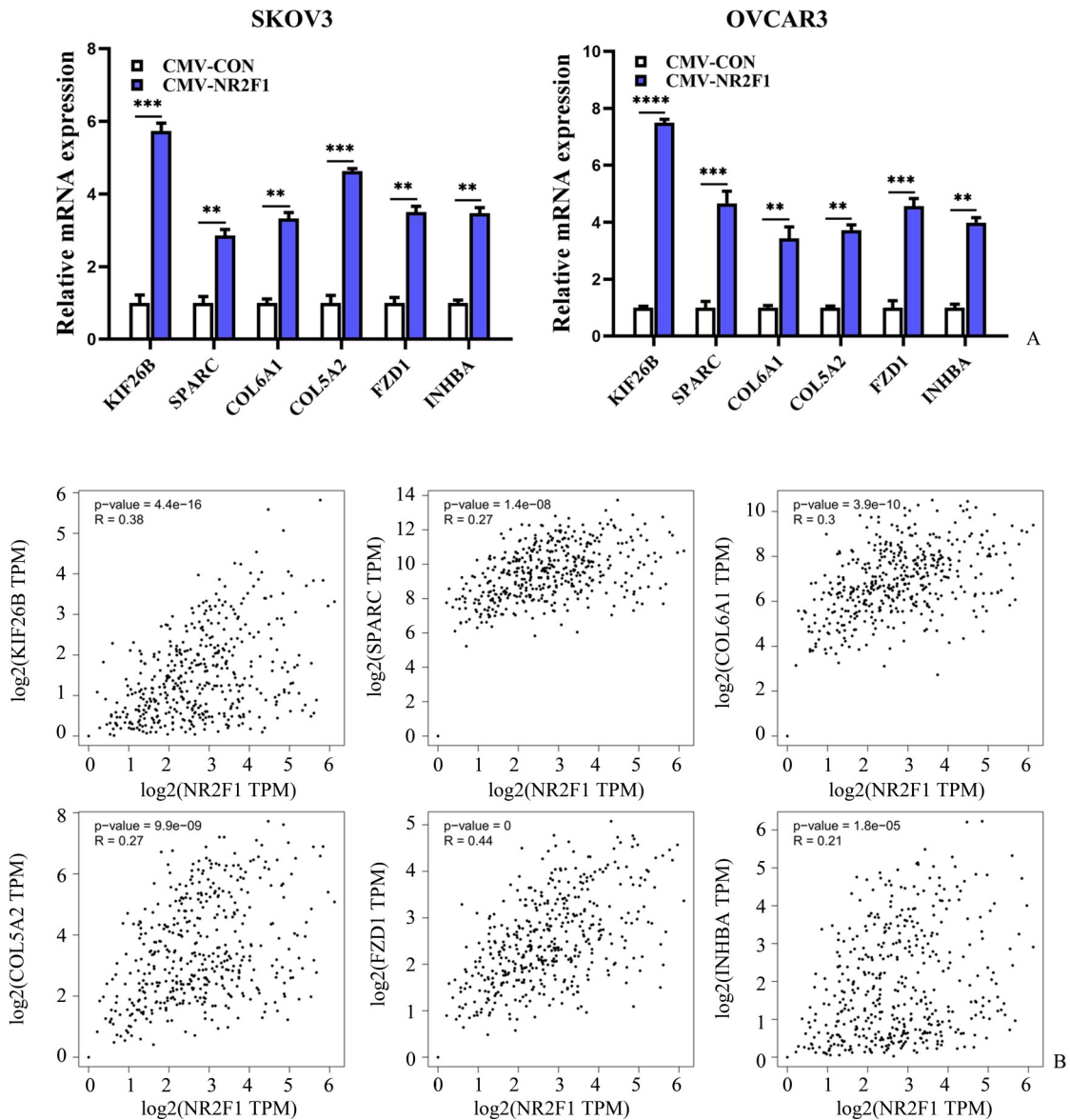
Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of differential genes in *NR2F1*-mediated dormant ovarian cancer cells

3 讨论

肿瘤休眠和转移复发是目前临床面临的巨大挑战,休眠的肿瘤细胞能够逃避治疗和免疫清除,在低于可检测水平的情况下存活,同时能够保持增殖潜力,数年之后又开始恢复生长^[12]。有研究发现 *NR2F1* 的水平通常在原发性肿瘤中较低,但在休眠的扩散性肿瘤细胞中表达较高,当肿瘤细胞再次开始增殖并形成复发性或转移性肿瘤时,*NR2F1* 蛋白的水平再次恢复低水平表达,*NR2F1* 分子被认为是细胞休眠的生物标志物,通过发挥负调控细胞周期的作用,从而抑制肿瘤细胞增殖^[9,13]。在对卵巢癌细胞株的研究中,我们利用 GEPIA 数据库研究分析证实:与正常组织相比,原发卵巢癌组织中的 *NR2F1* 分子表达较低。我们的研究也证实 *NR2F1* 过表达的卵巢癌细胞株也表现出明显的休眠特征,

其增殖能力下降,增殖相关分子 *KI67* 表达明显下降,同时,*p27*、*DEC-2* 和 *TGF- β 2* 细胞休眠相关分子表达升高,抗凋亡分子 *BCL-2* 表达也升高。这均说明上调卵巢癌细胞中的 *NR2F1* 分子能够诱导其进入休眠状态。此外,GEPIA 数据库生存分析结果显示卵巢癌肿瘤组织 *NR2F1* 表达高的患者总生存期较短。休眠的肿瘤细胞虽然增殖受到抑制,但对低氧、营养缺乏、免疫细胞攻击等恶劣环境的适应能力明显增强,休眠肿瘤细胞还对化疗药物具有很强的抵抗能力^[14-15]。因此,我们推测,原发卵巢癌肿瘤组织中大量肿瘤细胞并非处于休眠状态,伴以 *NR2F1* 较低表达水平,而 *NR2F1* 表达水平提高的过程中,卵巢癌肿瘤细胞增强了以上这些适应和抵抗能力,最终导致卵巢癌患者总生存期缩短。

有研究发现,*NR2F1* 表达升高可增强卵巢癌细胞对顺铂的抵抗能力^[16]。我们的研究表明 *NR2F1*



A: The mRNA expression of *KIF26B*, *SPARC*, *COL6A1*, *COL5A2*, *FZD1* and *INHBA* in the ovarian cancer cell of each group were assessed by qRT-PCR analysis. $n=3$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. B: GEPIA database analysis showed that the expression of *NR2F1* in OC tumor tissues was positively correlated with the expression of drug resistance-related genes *KIF26B*, *SPARC*, *COL6A1*, *COL5A2*, *FZD1* and *INHBA*. The degree of correlation is expressed by Pearson correlation coefficient R.

图5 耐药基因的表达及与NR2F1分子的相关分析

Fig. 5 Expression of drug resistance genes and correlation analysis with NR2F1 molecules

过表达卵巢癌细胞株对化疗药物(5-Fu、顺铂、紫杉醇)抵抗能力增强。通过高通量测序技术和KEGG通路富集分析对NR2F1过表达的卵巢癌细胞株转录组水平差异基因表达进行分析,发现NR2F1介导的休眠卵巢癌细胞中,差异上调蛋白的基因在PI3K-Akt信号通路、黏着斑、细胞外基质-受体相互作用以及调节干细胞多能性信号通路中显著富集。PI3K-Akt信号通路与肿瘤细胞的耐药

密切相关,有研究表明PI3K/Akt通路异常激活与卵巢癌的化疗耐药有关,该通路的抑制剂对克服卵巢癌的耐药具有潜在的应用价值^[17-18]。差异下调蛋白的基因在细胞周期等通路中显著富集,细胞周期调控通路受到抑制,这可能与NR2F1抑制卵巢癌细胞增殖有关。有研究提出BCL-2分子不仅在细胞凋亡中起着至关重要的作用,并且与卵巢癌的化疗耐药也密切相关,靶向BCL-2分子可逆转卵巢癌

细胞的铂耐药性^[19-20]。因此, *NR2F1* 过表达的卵巢癌细胞株中抗凋亡分子 *BCL-2* 升高, 这可能也与其增强卵巢癌细胞对化疗药物的抵抗能力相关。

KEGG 通路富集分析中我们发现, 富集于 PI3K-Akt 信号通路的差异蛋白的基因中, *KIF26B*、*SPARC*、*COL6A1* 和 *COL5A2* 分子可能和休眠卵巢癌耐药相关。以上分子与 PI3K-Akt 通路的相关性在此前已有报道^[21-24]。有文献指出, *KIF26B* 分子参与卵巢癌细胞耐药, 敲低 *KIF26B* 能够增强卵巢癌细胞对抗癌药物伊利司莫的敏感性^[25]。头颈部鳞状细胞癌对厄洛替尼产生的获得性耐药与癌症相关成纤维细胞内 *COL5A2* 分子的高度表达相关^[24]。Januchowski 等^[26]发现 *COL5A2* 表达的增加与卵巢癌细胞系对紫杉醇、顺铂等多种药物的耐药性相关。*SPARC* 和 *COL6A1* 分子参与肿瘤细胞耐药也均有报道^[27-29]。同时, 我们通过 KEGG 富集分析还发现, 富集于调节干细胞多能性的信号通路中的 *FZD1*、*INHBA* 分子也可能与休眠卵巢癌耐药相关。*FZD1*、*INHBA* 与调节干细胞多能性的信号通路相关也已知悉^[30-31]。在肿瘤耐药的研究中, Liu 等^[30]研究表明 *FZD1* 的异常激活赋予肿瘤细胞恶性特征, 包括细胞增殖、转移能力增强, 对化疗耐药以及

获得癌症干性。Zhang 等^[32]揭示在使用罗格列酮药物治疗过程中, 通过下调 *FZD1* 和 *MDR1* 基因从而抑制人卵巢癌细胞的多药耐药性。Zhang 等^[33]研究表明 *INHBA* 通过调节 Hippo 信号传导赋予结肠癌细胞由衰老介导的 5-Fu 化疗耐药。我们实验验证了 *NR2F1* 过表达的 OC 细胞中 *KIF26B*、*SPARC*、*COL6A1*、*COL5A2*、*FZD1* 和 *INHBA* 分子表达均明显升高。同时利用 GEPIA 数据库分析卵巢癌中这些分子与 *NR2F1* 分子表达呈正相关, 得到了进一步的验证。因此, 能够初步确定这些分子表达的升高可能与 *NR2F1* 介导的休眠卵巢癌细胞对化疗药物抵抗能力的增强有关。

本课题提示了休眠卵巢癌耐药机制中的重要相关分子, 为解决休眠卵巢癌耐药治疗的问题提供了一些思路。但本研究仍存在一定的局限和不足, 若能在现有基础上增加卵巢癌临床组织样本进行验证, 本研究将得到进一步完善, 同时, 研究中增加更多的化疗药物种类能够更加全面研究休眠卵巢癌的多药耐药性。此外, *KIF26B*、*SPARC*、*COL6A1*、*COL5A2*、*FZD1* 和 *INHBA* 在 *NR2F1* 介导的休眠卵巢癌细胞中发挥增强化疗药物抵抗能力的具体作用方式及深入的机制仍需进一步的体内外实验验证。

参考文献

- [1] Kuroki L, Guntupalli SR. Treatment of epithelial ovarian cancer[J]. *BMJ*, 2020, 371: m3773.
- [2] 孙梦娜, 徐盈, 任晨璐, 等. 拷贝数变异在卵巢癌中的研究进展[J]. *新医学*, 2024, 55(9): 738-744.
Sun MN, Xu Y, Ren CL, et al. Research progress on copy number variation in ovarian cancer[J]. *J New Med*, 2024, 55(9): 738-744.
- [3] González-Martín A, Harter P, Leary A, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian cancer: ESMO clinical practice guideline for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2023, 34(10): 833-848.
- [4] Lheureux S, Gourley C, Vergote I, et al. Epithelial ovarian cancer[J]. *Lancet*, 2019, 393(10177): 1240-1253.
- [5] Gomatou G, Syrigos N, Vathiotis IA, et al. Tumor dormancy: implications for invasion and metastasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4862.
- [6] Rossari F, Zucchini C, Buda G, et al. Tumor dormancy as an alternative step in the development of chemoresistance and metastasis—clinical implications [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2019, 43(2): 155-176.
- [7] Shepherd TG, Dick FA. Principles of dormancy evident in high-grade serous ovarian cancer [J]. *Cell Div*, 2022, 17(1): 2.
- [8] Sosa MS, Parikh F, Maia AG, et al. NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RAR β -driven quiescence programmes[J]. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 6170.
- [9] Liu Y, Zhang P, Wu Q, et al. Long non-coding RNA NR2F1-AS1 induces breast cancer lung metastatic dormancy by regulating NR2F1 and Δ Np63 [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5232.
- [10] Gao XL, Zheng M, Wang HF, et al. NR2F1 contributes to cancer cell dormancy, invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma by activating CXCL12/CXCR4 pathway[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 743.
- [11] Khalil BD, Sanchez R, Rahman T, et al. An NR2F1-specific agonist suppresses metastasis by inducing cancer cell dormancy[J]. *J Exp Med*, 2022, 219(1): e20210836.
- [12] Weston WA, Barr AR. A cell cycle centric view of tumour dormancy[J]. *Br J Cancer*, 2023, 129(10): 1535-1545.
- [13] Wu R, Roy AM, Tokumaru Y, et al. NR2F1, a tumor

- dormancy marker, is expressed predominantly in cancer-associated fibroblasts and is associated with suppressed breast cancer cell proliferation [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(12): 2962.
- [14] Liu R, Zhao Y, Su S, et al. Unveiling cancer dormancy: intrinsic mechanisms and extrinsic forces [J]. *Cancer Lett*, 2024, 591: 216899.
- [15] Zhang M, Peng R, Wang H, et al. Nanog mediated by FAO/ACLY signaling induces cellular dormancy in colorectal cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(2): 159.
- [16] Liang Q, Xu Z, Liu Y, et al. NR2F1 regulates TGF- β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition affecting platinum sensitivity and immune response in ovarian cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(19): 4639.
- [17] Liu R, Chen Y, Liu G, et al. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9): 797.
- [18] Agrawal M, Agrawal SK, Chopra K. Overcoming drug resistance in ovarian cancer through PI3K/AKT signaling inhibitors [J]. *Gene*, 2025, 948: 149352.
- [19] Yuan J, Lan H, Jiang X, et al. Bcl-2 family: novel insight into individualized therapy for ovarian cancer [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(4): 1255-1265.
- [20] Yang Y, Li S, Sun Y, et al. Reversing platinum resistance in ovarian cancer multicellular spheroids by targeting Bcl-2 [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 897-906.
- [21] Liu Y, Zhang X, Pan R, et al. KIF26B is overexpressed in medulloblastoma and promotes malignant progression by activating the PI3K/AKT pathway [J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2022, 2022: 2552397.
- [22] Deng S, Zhang L, Li J, et al. Activation of the PI3K-AKT signaling pathway by SPARC contributes to the malignant phenotype of cholangiocarcinoma cells [J]. *Tissue Cell*, 2022, 76: 101756.
- [23] Chen Z, Wu Q, Yan C, et al. COL6A1 knockdown suppresses cell proliferation and migration in human aortic vascular smooth muscle cells [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(3): 1977-1984.
- [24] Guo Y, Chen M, Yang J, et al. CAF-secreted COL5A2 activates the PI3K/AKT pathway to mediate erlotinib resistance in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oral Dis*, 2025, 31(2): 376-386.
- [25] Yang B, Yang J, Zhang K. A cuproptosis-related signature predicts prognosis and indicates cross-talk with immunocyte in ovarian cancer [J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1): 141.
- [26] Januchowski R, Świerczewska M, Sterzyńska K, et al. Increased expression of several collagen genes is associated with drug resistance in ovarian cancer cell Lines [J]. *J Cancer*, 2016, 7(10): 1295-1310.
- [27] Wang M, Wang Y, Pan X, et al. Acquired resistance to immunotherapy by physical barriers with cancer cell-expressing collagens in non-small cell lung cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2025, 122(24): e2500019122.
- [28] Wan S, He QY, Yang Y, et al. SPARC stabilizes ApoE to induce cholesterol-dependent invasion and sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2024, 84(11): 1872-1888.
- [29] Xiang J, Zhang H, Shen K, et al. SPARC promotes aerobic glycolysis and 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer through the STAT3/HK2 axis [J]. *Cancer Med*, 2025, 14(11): e70972.
- [30] Liu HY, Sun XJ, Xiu SY, et al. Frizzled receptors (FZDs) in Wnt signaling: potential therapeutic targets for human cancers [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, 45(8): 1556-1570.
- [31] Ma R, Feng D, Chen J, et al. Targeting tumor heterogeneity by breaking a stem cell and epithelial niche interaction loop [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(26): e2307452.
- [32] Zhang H, Jing X, Wu X, et al. Suppression of multidrug resistance by rosiglitazone treatment in human ovarian cancer cells through downregulation of FZD1 and MDR1 genes [J]. *Anticancer Drugs*, 2015, 26(7): 706-715.
- [33] Zhang Z, Chen L, Yang Q, et al. INHBA regulates hippo signaling to confer 5-flu chemoresistance mediated by cellular senescence in colon cancer cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2024, 171: 106570.

(编辑 孙慧兰)