

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.01.005

## 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

靖芳<sup>1</sup>, 靖超<sup>2</sup>, 金冬梅<sup>3</sup> (1. 武汉市第三医院 妇科, 湖北 武汉 430061; 2. 新洲区仓埠中心卫生院 口腔科, 湖北 武汉 430413; 3. 武汉市第三医院 病理科, 湖北 武汉 430061)

**[摘要]** **目的:** 探讨鞘磷脂合成酶2(SMS2)是否通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路调控卵巢癌(OC)TOV-21G细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡及其机制。**方法:** 收集武汉市第三医院2022年7月至2023年5月间确诊的21例OC患者的癌及癌旁组织标本, 免疫组化法检测OC组织SMS2表达水平。体外培养TOV-21G细胞, 将细胞分为对照组、shRNA慢病毒阴性对照组(sh-NC组)、SMS2 shRNA慢病毒组(sh-SMS2组)、Wnt/ $\beta$ -catenin通路激活剂组LiCl(LiCl组)和sh-SMS2+LiCl组。Edu染色法、Transwell法、流式细胞术分别检测各组细胞的增殖、迁移和侵袭能力及凋亡水平, WB法检测细胞中SMS2、Ki67、cyclin D1、BAX、c-caspase3、Bcl-2及Wnt/ $\beta$ -catenin通路蛋白( $\beta$ -catenin、c-Myc、MMP-9)的表达。构建TOV-21G细胞裸鼠移植瘤模型, 观察敲低SMS2对移植瘤生长和SMS2、 $\beta$ -catenin表达的影响。**结果:** 与癌旁组织比较, OC组织中SMS2呈高表达( $P<0.01$ )。转染sh-SMS2后, TOV-21G细胞中SMS2表达水平显著降低( $P<0.05$ ), 细胞的增殖、迁移和侵袭能力及Bcl-2、 $\beta$ -catenin、c-Myc、MMP-9蛋白表达均显著降低(均 $P<0.05$ ), 细胞凋亡率、BAX、c-caspase3蛋白表达均显著升高(均 $P<0.05$ ); LiCl处理能逆转敲低SMS2对TOV-21G细胞增殖、迁移和侵袭及Wnt/ $\beta$ -catenin通路的抑制作用(均 $P<0.05$ )。体内成瘤实验显示, 敲低SMS2抑制裸鼠移植瘤的生长及SMS2、 $\beta$ -catenin蛋白的表达(均 $P<0.05$ )。**结论:** 敲低SMS2表达通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路抑制OC TOV-21G细胞的增殖、迁移、侵袭并促进细胞凋亡, 同时LiCl处理则能逆转敲低SMS2对TOV-21G细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。

**[关键词]** 鞘磷脂合成酶2; 卵巢癌; TOV-21G细胞; 增殖; 迁移; 侵袭; 凋亡; Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路

**[中图分类号]** R737.31; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)01-0032-08

## Sphingomyelin synthase 2 regulates the malignant biological behaviors of ovarian cancer TOV-21G cells through Wnt/ $\beta$ -catenin pathway

JING Fang<sup>1</sup>, JING Chao<sup>2</sup>, JIN Dongmei<sup>3</sup> (1. Department of Gynecology, the Third Hospital of Wuhan, Wuhan 430061, Hubei, China; 2. Department of Stomatology, Cangbu Central Health Center of Xinzhou District, Wuhan 430413, Hubei, China; 3. Department of Pathology, the Third Hospital of Wuhan, Wuhan 430061, Hubei, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate whether sphingomyelin synthase 2 (SMS2) regulates the proliferation, migration, invasion and apoptosis of ovarian cancer (OC) TOV-21G cells through Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and its mechanism. **Methods:** The cancer and para-cancerous tissue samples of 21 OC patients diagnosed in the Third Hospital of Wuhan from July 2022 to May 2023 were collected, and the SMS2 expression in the collected tissues was detected by immunohistochemistry. TOV-21G cells were cultured *in vitro* and grouped into control group, shRNA lentivirus negative control group (sh-NC group), SMS2 shRNA lentivirus group (sh-SMS2 group), Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activator LiCl group (LiCl group), and sh-SMS2+LiCl group. Edu staining, Transwell method and flow cytometry were used to detect the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of cells in each group. WB assay was used to detect the expression of SMS2, Ki67, cyclin D1, BAX, c-caspase3, Bcl-2 and Wnt/ $\beta$ -catenin pathway-related proteins ( $\beta$ -catenin, c-Myc, MMP-9) in the cells of each group. A TOV-21G cell transplanted tumor model was established in nude mice to observe the effects of SMS2 knockdown on the growth of transplanted tumors and the expression of SMS2 and  $\beta$ -catenin. **Results:** Compared with the para-cancerous tissues, the expression of SMS2 in OC tissues was increased obviously ( $P<0.05$ ). After transfection with sh-SMS2, the expression level of SMS2 in TOV-21G cells was decreased obviously ( $P<0.05$ ), the proliferation, migration, and invasion abilities of TOV-21G cells as well as the protein expression of Bcl-2,  $\beta$ -catenin, c-Myc, and MMP-9 were decreased obviously (all  $P<0.05$ ), and the cell apoptosis rate, the protein expression of BAX and c-caspase3 were obviously increased (all  $P<0.05$ ). LiCl could reverse the

**[基金项目]** 武汉市卫生健康委员会医学科研项目(No. WX21Q22)

**[作者简介]** 靖芳(1984—), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤的诊治研究。E-mail: ybbeenvs@163.com

**[通信作者]** 靖芳, E-mail: ybbeenvs@163.com

inhibitory effects of SMS2 knockdown on the proliferation, migration, invasion, and Wnt/ $\beta$ -catenin pathway of TOV-21G cells (all  $P < 0.05$ ). *In vivo* tumor formation experiments showed that SMS2 knockdown inhibited tumor growth and the expression of SMS2 and  $\beta$ -catenin (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** SMS2 knockdown inhibits the proliferation, migration and invasion and promotes apoptosis of OC TOV-21G cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, while LiCl treatment can reverse the inhibitory effects of SMS2 knockdown on the proliferation, migration and invasion of TOV-21G cells.

**[Key words]** sphingomyelin synthase 2 (SMS2); ovarian cancer (OA); TOV-21G cell; proliferation; migration; invasion; apoptosis; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(1): 32-39. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.01.005]

卵巢癌(ovarian cancer, OC)是妇科常见恶性肿瘤之一,大多数OC患者确诊时已处于疾病晚期或已发生转移。尽管大多数OC患者最初对铂类化疗药物有反应,但仍会复发并产生耐药性<sup>[1-2]</sup>。因此,亟需寻找有效的治疗靶点来改善OC的治疗策略。Wnt/ $\beta$ -catenin是一种遗传保守的信号通路,参与细胞增殖、凋亡和分化等生物学过程<sup>[3-4]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin异常激活是OC发生发展的重要因素之一,抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路能抑制OC细胞增殖、迁移和侵袭,并诱导细胞凋亡<sup>[5-6]</sup>。鞘磷脂合成酶2(sphingomyelin synthase 2, SMS2)是神经鞘磷脂合成酶(sphingomyelin synthase, SMS)的同工酶之一,可催化合成鞘磷脂(sphingomyelin, SM)和甘油二酯,调控细胞内神经酰胺(ceramide, Cer)和SM水平,影响细胞的生物学行为<sup>[7]</sup>。SMS2的表达与OC发生发展具有相关性,既往研究<sup>[8]</sup>显示,SMS2在OC患者组织和细胞中表达上调,抑制SMS2表达可抑制OC细胞的迁移、增殖和存活。研究<sup>[9]</sup>显示,SMS2通过激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路促进H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的内皮功能障碍,然而,SMS2是否通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路调控OC细胞的增殖、迁移、侵袭及凋亡尚未见报道。本研究通过在TOV-21G细胞中敲低SMS2表达,探讨SMS2是否通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路调控TOV-21G细胞的恶性生物学行为及其机制,为OC的治疗提供新的思路与策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本、细胞、实验动物及主要试剂

收集2022年7月至2023年5月间武汉市第三医院21例经病理学确诊的OC患者的癌及癌旁组织标本,其中TNM分期I、II、III期各7例。所有患者均为首次确诊且未接受过化疗和放疗。每位患者都签署知情同意书,研究方案得到所在医院医学伦理委员会的批准(伦理审批号:20220301)。TOV-21G细胞购自中国科学院细胞库。雌性、7周龄BALB/c裸鼠购自湖北省实验动物研究中心[实验动物许可证号:SCXK(鄂)2020-0018]。RPMI 1640培养基(11875101)、胰蛋白酶(15090046)购自美国Gibco公

司,Wnt/ $\beta$ -catenin通路激活剂氯化锂(LiCl,L7026)购自美国Sigma-Aldrich公司,TRIzol(15596026)、Edu细胞增殖检测试剂盒(CA1170)购自北京索莱宝科技有限公司,SYBR Green PCR Master(S9194)购自美国Sigma公司,Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(CW2574S)购自美国BD公司,Transwell小室(3412)购自北京阳科华科技有限公司,结晶紫(C0121)、抗兔Alexa Fluor 488免疫荧光试剂盒(P0176)购自碧云天生物技术有限公司,sh-SMS2(sh-SMS2#1序列为5'-ACCGTCATGATCACAGTTGTA-3',sh-SMS2#2序列为5'-ACCGTCATGATCACAGTTTA-3'。其中,sh-SMS2#1的沉默效果优于sh-SMS2#2,因此选择sh-SMS2#1进行SMS2敲低实验)、sh-NC质粒、兔源一抗BAX(sc-7480)、c-Myc(sc-40)、cyclin D1(sc-8396)、 $\beta$ -catenin(sc-7963)、MMP-9(sc-393859)抗体均购自Santa Cruz Biotechnology,兔源一抗Ki67(ab16667)、c-caspase3(ab32042)、Bcl-2(ab182858)抗体购自英国Abcam公司,HRP标记山羊抗兔IgG二抗购自美国CST公司。

### 1.2 免疫组化法检测OC组织中SMS2蛋白的表达

切取部分OC组织及癌旁组织标本,用4%多聚甲醛溶液固定并常规石蜡包埋、切片。将切片脱蜡、水化后用0.01 mol/L的柠檬酸钠缓冲液进行抗原修复后滴加3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液于室温下反应15 min,然后用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,10%山羊血清中室温下封闭30 min,将切片用兔抗人SMS2抗体(稀释比例为1:200)4 °C下作用24 h,然后在HRP偶联的二抗(稀释比例为1:200)中室温下反应2 h。二氨基联苯胺(DAB)染液中染色3 min后,在光学显微镜下观察SMS2阳性表达情况。通过细胞核或细胞质的染色判断结果为阳性,并用光学显微镜观察整个切片中染色细胞的百分比进行评分。(1)阳性着色强度评分:0分,未着色;1分,淡黄色;2分,棕色;3分,深褐色。(2)染色细胞的百分比评分:0分,无阳性细胞;1分,1%~<25%阳性细胞;2分,25%~<50%阳性细胞;3分,50%~<75%阳性细胞;4分,75%~100%阳性细胞。结果判定时将(1)、(2)两个参数的分数相乘,最终分类如下:阴性(-)为0~2分,弱阳性(+)为3~4

分,中度阳性(++)为5~8分,强阳性(+++)为9~12分。(-)、(+)为低表达,(++),(+++为高表达。

### 1.3 细胞培养及分组转染

将TOV-21G细胞接种在10% FBS的RPMI 1640培养基中,置入37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。将对数生长期TOV-21G细胞接种在6孔板(1×10<sup>6</sup>个/孔)中,待细胞汇合度达70%时进行传代培养。将细胞分为对照组、shRNA慢病毒阴性对照组(sh-NC组)、SMS2 sh-RNA慢病毒组(sh-SMS2组)、Wnt/β-catenin通路激活剂LiCl处理组(LiCl组,用含30 mmol/L LiCl的培养基处理24 h<sup>[10]</sup>)、sh-SMS2+LiCl组(感染sh-SMS2慢病毒后,用含30 mmol/L LiCl的培养基处理24 h),按照Lipo6000™转染试剂盒说明书方法转染各组TOV-21G细胞,感染复数(multiple of infection, MOI)为50。培养24 h后,验证SMS2表达情况和转染效率。

### 1.4 qPCR法检测TOV-21G细胞中SMS2 mRNA的表达水平

按照TRIzol试剂盒说明书提取细胞总RNA,并用逆转录试剂盒将RNA逆转录成cDNA,以cDNA为模板,进行qPCR反应。引物序列:SMS2正向引物序列为5'-ATAGCCCTCAGTCATGATT-3',反向引物序列为5'-CAGCACATGACAACGGTTCA-3';β-actin正向引物序列为5'-GATCATTGCTCCTCCTGAGC-3',反向引物序列为5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'。qPCR反应条件:95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s,55 °C退火10 s,72 °C延伸15 s,共计40个循环。以2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算目的基因mRNA的相对表达量。

### 1.5 Edu染色法检测TOV-21G细胞的增殖能力

收集各组TOV-21G细胞,接种在24孔板中(1×10<sup>5</sup>个/孔),培养24 h后,加入10 μmol/L Edu溶液,4%多聚甲醛溶液室温固定30 min,洗去固定液,加入1×Apollo染色液,避光培养30 min,DAPI复染,荧光显微镜下观察Edu阳性细胞,按照公式“Edu阳性细胞率=Edu阳性细胞数/细胞总数×100%”计算Edu阳性细胞率。

### 1.6 Transwell实验检测TOV-21G细胞的迁移和侵袭能力

将各组TOV-21G细胞置于无血清培养基中培养,并制成细胞密度为2×10<sup>5</sup>个/mL的细胞悬液,取100 μL加入到Transwell上室(预铺基质胶的上室用于细胞侵袭实验,未铺基质胶的上室用于细胞迁移实验),下室中加入600 μL10% FBS的培养基,培养24 h,棉签擦去上室面的细胞,4%多聚甲醛溶液固定30 min,PBS洗涤后,在0.3%结晶紫染液中染色30 min,在倒置显微镜下观察穿膜细胞,随机选取

5个视野,统计每个视野穿膜细胞数量。

### 1.7 流式细胞术检测TOV-21G细胞的凋亡水平

收集各组TOV-21G细胞,用PBS洗涤并以1 000×g离心5 min,后向细胞中加入500 μL结合缓冲液重悬细胞,将细胞密度调整为4×10<sup>5</sup>个/mL。随后,加入5 μL Annexin V和5 μL PI,避光反应15 min,上流式细胞仪检测细胞的凋亡水平。

### 1.8 WB法检测OA组织和TOV-21G细胞中增殖、凋亡及Wnt/β-catenin信号通路相关蛋白的表达水平

取部分癌和癌旁组织样本及各组TOV-21G细胞,RIPA裂解,BCA试剂盒测定蛋白质浓度,进行10%SDS-PAGE,将蛋白质条带转至PVDF膜上,在5%脱脂奶粉中封闭1 h,加入稀释比例均为1:1 000的SMS2、Ki67、cyclin D1、c-caspase3、c-Myc、MMP-9、β-catenin及稀释比例均为1:2 000的BAX、Bcl-2和β-actin抗体,4 °C下反应过夜。TBST洗涤后,加入稀释比例为1:2 000的HRP标记山羊抗兔IgG二抗,室温下反应1 h,TBST洗涤后,在ECL中曝光显影,以Image J软件分析蛋白质条带的灰度值。

### 1.9 TOV-21G细胞裸鼠移植瘤模型的构建及观察

取200 μL sh-NC、sh-SMS2慢病毒感染的TOV-21G细胞悬液(1×10<sup>7</sup>个/mL),经左侧腋部皮下接种在BALB/c裸鼠体内,采用随机数字表法将裸鼠随机分为sh-NC组、sh-SMS2组(5只/组)。每周观察移植瘤的生长情况,4周后,测量、计算移植瘤体积和质量。麻醉后处死裸鼠,剥离移植瘤组织,WB法检测移植瘤组织中SMS2蛋白表达水平,方法同1.8。

### 1.10 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。采用SPSS 22.0软件分析相关实验数据,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用LSD-*t*检验,多组间数据比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

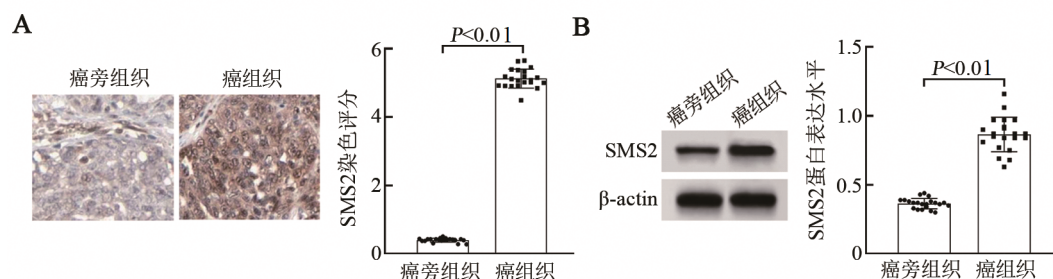
### 2.1 SMS2蛋白在OC组织中呈高表达

免疫组化染色结果(图1A)显示,OC组织中SMS2阳性表达水平显著高于癌旁组织( $P < 0.01$ )。WB法检测结果(图1B)印证了免疫组化染色结果,OC组织中SMS2表达显著高于癌旁组织( $P < 0.01$ )。结果表明,OC组织中SMS2蛋白呈高表达。

### 2.2 成功构建敲低SMS2的TOV-21G细胞

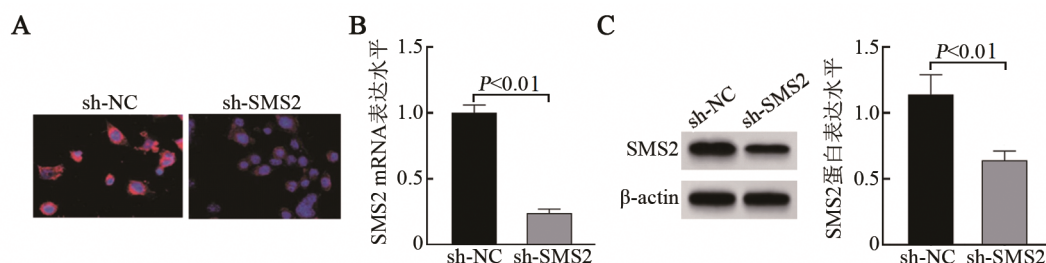
荧光染色结果(图2A)显示,慢病毒MOI为50时,显示转染效率最高,细胞状态较好。qPCR和WB法检测结果(图2B、2C)显示,sh-SMS2组SMS2 mRNA

和蛋白表达水平均显著低于 sh-NC 组(均  $P < 0.01$ )。sh-SMS2 慢病毒, 可以进行后续功能实验。结果提示, 在 TOV-21G 细胞中成功感染 sh-NC 和



A: 免疫组化法检测 OC 组织与癌旁组织中 SMS2 蛋白表达( $\times 100$ ); B: WB 法检测 OC 组织与癌旁组织中 SMS2 蛋白表达。

图 1 OC 组织与癌旁组织中 SMS2 蛋白表达水平比较



A: TOV-21G 细胞转染后的荧光图像( $\times 400$ ; 红色为 Edu 染色, 蓝色为 DAPI 染色); B: qPCR 法检测 TOV-21G 细胞中 SMS2 mRNA 的表达水平; C: WB 法检测 TOV-21G 细胞中 SMS2 蛋白的表达水平。

图 2 敲低 SMS2 对 TOV-21G 细胞中 SMS2 mRNA 和蛋白表达的影响

### 2.3 敲低 SMS2 降低 TOV-21G 细胞增殖能力并促进细胞凋亡

Edu 染色法、流式细胞术、WB 法检测结果(图 3A、3B、3C)显示, 与对照组比较, LiCl 组 Edu 阳性细胞率和 Ki67、cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达水平均显著升高(均  $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率和 BAX、c-caspase3 蛋白表达水平均显著降低(均  $P < 0.05$ ); 与 sh-NC 组比较, sh-SMS2 组 Edu 阳性细胞率和 Ki67、cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达水平均显著降低(均  $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率和 BAX、c-caspase3 蛋白表达均显著升高(均  $P < 0.05$ ); 与 sh-SMS2 组比较, sh-SMS2+LiCl 组 Edu 阳性细胞率和 Ki67、cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达水平均显著升高(均  $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率和 BAX、c-caspase3 蛋白表达水平均显著降低(均  $P < 0.05$ ); 与 LiCl 组比较, sh-SMS2+LiCl 组 Edu 阳性细胞率和 Ki67、cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达水平均显著降低(均  $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率和 BAX、c-caspase3 蛋白表达水平均显著升高(均  $P < 0.05$ )。结果表明, 敲低 SMS2 表达降低 TOV-21G 细胞的增殖能力并促进细胞凋亡, 而同时 LiCl 处理则逆转敲低 SMS2 对细胞的增殖抑制和凋亡促进作用。

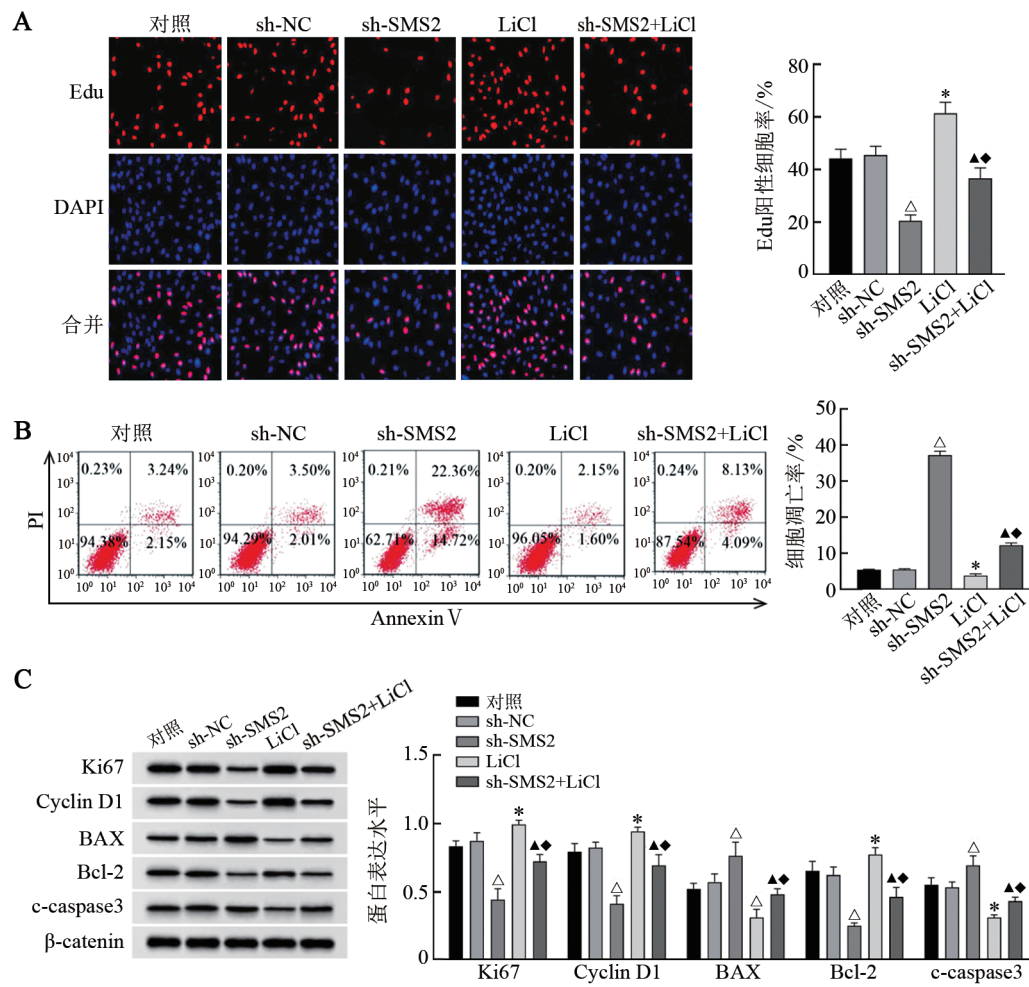
### 2.4 敲低 SMS2 降低 TOV-21G 细胞迁移和侵袭能力

Transwell 实验结果(图 4)显示, 与对照组比较, LiCl 组 TOV-21G 细胞迁移和侵袭数目均显著增加

(均  $P < 0.05$ ); 与 sh-NC 组比较, sh-SMS2 组细胞迁移和侵袭数目均显著减少(均  $P < 0.05$ ); 与 sh-SMS2 组比较, sh-SMS2+LiCl 组细胞迁移和侵袭数目均显著增加(均  $P < 0.05$ ); 与 LiCl 组比较, sh-SMS2+LiCl 组细胞迁移和侵袭数目均显著减少(均  $P < 0.05$ )。结果表明, 敲低 SMS2 表达降低 TOV-21G 细胞迁移和侵袭能力, 而同时 LiCl 处理则逆转敲低 SMS2 对细胞迁移和侵袭的抑制作用。

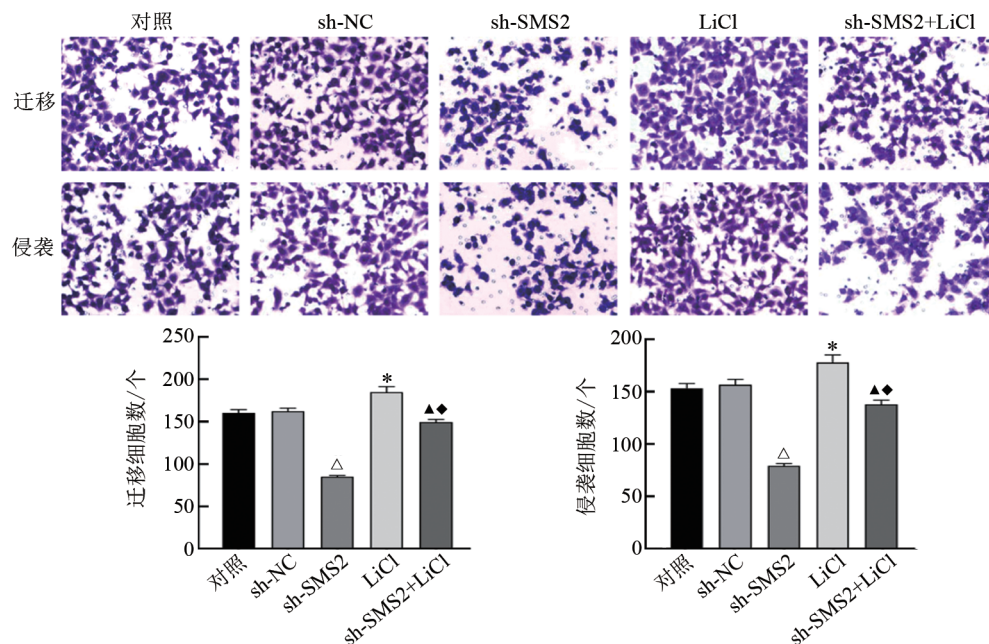
### 2.5 敲低 SMS2 对 TOV-21G 细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响

WB 法检测结果(图 5)显示, 与对照组比较, LiCl 组 TOV-21G 细胞中  $\beta$ -catenin、c-Myc、MMP-9 蛋白表达均显著升高(均  $P < 0.05$ ); 与 sh-NC 组比较, sh-SMS2 组细胞中  $\beta$ -catenin、c-Myc、MMP-9 蛋白表达均显著降低(均  $P < 0.05$ ); 与 sh-SMS2 组比较, sh-SMS2+LiCl 组细胞中  $\beta$ -catenin、c-Myc、MMP-9 蛋白表达水平均显著升高(均  $P < 0.05$ ); 与 LiCl 组比较, sh-SMS2+LiCl 组细胞中  $\beta$ -catenin、c-Myc、MMP-9 蛋白表达均显著降低(均  $P < 0.05$ )。结果表明, 敲低 SMS2 表达降低 TOV-21G 细胞中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白表达水平, 而同时 LiCl 处理则逆转敲低 SMS2 对细胞中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白表达的抑制作用。



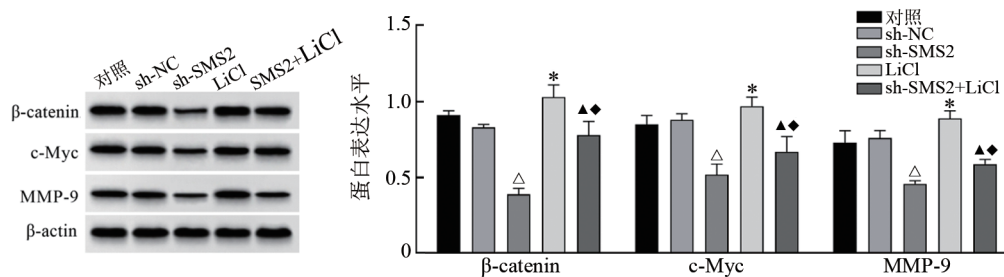
A: Edu 染色法检测各组细胞的增殖水平( $\times 100$ ); B: 流式细胞术检测各组细胞的凋亡水平; C: WB 法检测各组细胞增殖与凋亡相关蛋白的表达水平。与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 sh-NC 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 sh-SMS2 组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$ ; 与 LiCl 组比较,  $\blacklozenge P < 0.05$ 。

图3 敲低 SMS2 和 LiCl 处理对 TOV-21G 细胞增殖与凋亡的影响



与与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 sh-NC 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 sh-SMS2 组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$ ; 与 LiCl 组比较,  $\blacklozenge P < 0.05$ 。

图4 敲低 SMS2 和 LiCl 处理对 TOV-21G 细胞迁移和侵袭的影响(结晶紫染色,  $\times 200$ )



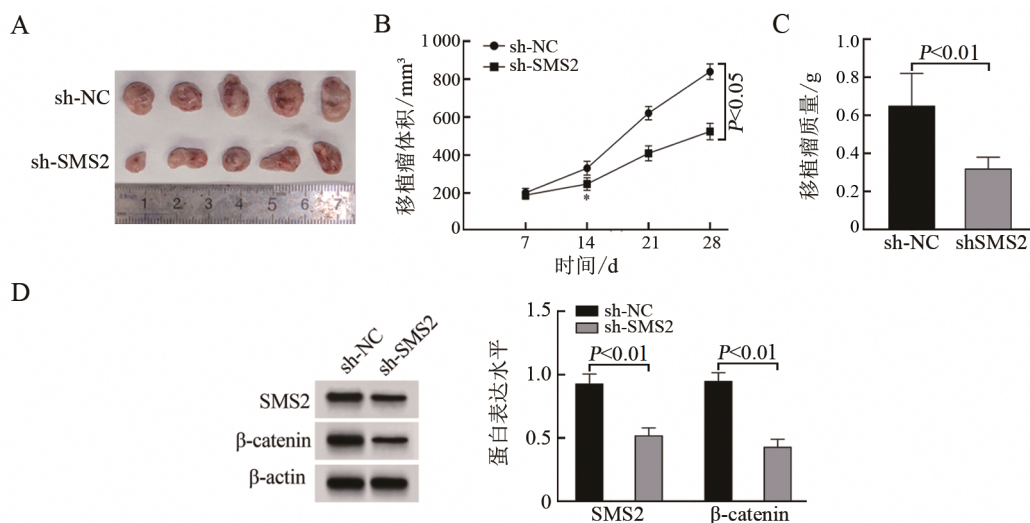
与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 sh-NC 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 sh-SMS2 组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$ ; 与 LiCl 组比较,  $\blacklozenge P < 0.05$ 。

图5 敲低 SMS2 和 LiCl 处理对 TOV-21G 细胞中  $\beta$ -catenin、c-Myc 和 MMP-9 蛋白表达的影响

### 2.6 敲低 SMS2 显著抑制 TOV-21G 细胞裸鼠移植瘤的生长

成功建立 TOV-21G 细胞裸鼠移植瘤模型。与 sh-NC 组比较, sh-SMS2 组裸鼠移植瘤体积和质量均显著降低(均  $P < 0.05$ , 图 6A~C)。WB 法检测结果

(图 6D)显示, sh-SMS2 组裸鼠移植瘤组织中 SMS2、 $\beta$ -catenin 蛋白表达水平均显著低于 sh-NC 组(均  $P < 0.01$ )。结果表明, 敲低 SMS2 显著抑制 TOV-21G 细胞裸鼠移植瘤的生长。



A: 各组裸鼠移植瘤的外形; B: 各组裸鼠移植瘤的体积变化; C: 各组裸鼠移植瘤的质量变化;

D: WB 法检测移植瘤组织中 SMS2、 $\beta$ -catenin 蛋白表达水平。

图6 敲低 SMS2 对 TOV-21G 细胞裸鼠移植瘤生长的影响

### 3 讨论

SMS 是参与 SM 生物合成的最后一种酶, 在质膜稳态和动力学及许多细胞过程中起关键作用。SMS2 主要位于细胞膜上, 其通过调节 Cer 和 SM 水平影响肿瘤进展。据报道, SMS2 在多种类型肿瘤中呈高表达并参与肿瘤转移, 如 OC<sup>[8]</sup>、乳腺癌<sup>[11]</sup>、肝癌<sup>[12]</sup>。研究<sup>[13]</sup>发现, 抑制 SMS2 可抑制恶性淋巴瘤浸润并延长移植瘤模型小鼠的存活时间。DENG 等<sup>[14]</sup>发现, 敲低 SMS2 能减少体外 M2 型巨噬细胞的产生, 并抑制三阴性乳腺癌小鼠模型移植瘤的生长和肺转移。本研究发现, SMS2 在 OC 组织中表达上调, 与前人<sup>[8]</sup>报道一致, 提示 SMS2 在 OC 中可能发挥促癌基因

的作用。

SMS2 在细胞增殖和凋亡中发挥重要作用<sup>[15-16]</sup>。SMS2 缺失可导致 SMS 活性降低, 抑制细胞增殖、侵袭, 促进细胞凋亡<sup>[11,17]</sup>; 过表达 SMS2 能增加 c-Myc、c-caspase3、死亡受体 4 (DR4)/DR5 的表达来提高 HepG2 细胞对顺铂的敏感性<sup>[12]</sup>。细胞迁移和侵袭是肿瘤细胞发生转移的重要机制。相关研究表明, SMS 可调节细胞的增殖/存活和迁移<sup>[18]</sup>, 抑制 SMS2 表达可抑制 OC 细胞的迁移和侵袭<sup>[8]</sup>。为了验证 SMS2 在 OC 发生发展中的作用, 本研究采用 shRNA 慢病毒感染 TOV-21G 细胞以敲低 SMS2 表达, 结果显示, 敲低 SMS2 可降低 Edu 阳性细胞率及迁移和侵袭细胞数, 提高细胞凋亡率, 表明敲低 SMS2 可抑制

TOV-21G 细胞增殖、迁移和侵袭, 促进细胞凋亡。WB 实验结果显示, 敲低 SMS2 可降低 Ki67、cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达, 升高 BAX、c-caspase3 蛋白表达, 进一步证实敲低 SMS2 可抑制 TOV-21G 细胞增殖并促进细胞凋亡。

Wnt 是一种分泌型糖蛋白, 在各种组织或细胞中广泛表达。当 Wnt 信号被激活时, Wnt 配体与卷曲蛋白 (FZD)、低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (LRP5/6) 结合, 进行信号转导;  $\beta$ -catenin 进入细胞核, 可激活下游蛋白 c-Myc、cyclin D1、MMP-9 表达, 而这些蛋白可调控细胞周期和细胞增殖<sup>[19]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路是 OC 治疗的重要靶点, 抑制该通路可抑制细胞增殖、侵袭和转移<sup>[20-22]</sup>。在本研究中, 敲低 SMS2 可降低  $\beta$ -catenin、c-Myc、MMP-9 蛋白表达, 表明敲低 SMS2 可抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的活化, 推测敲低 SMS2 在 OC 中的抑癌作用可能与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路有关。为了进一步验证此推测, 本研究使用 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路激活剂 LiCl 进行回复实验, 结果显示, LiCl 能促进  $\beta$ -catenin、c-Myc、MMP-9 蛋白表达, 且能逆转敲低 SMS2 对细胞增殖、迁移和侵袭及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的抑制作用, 说明敲低 SMS2 可通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制 TOV-21G 细胞的恶性生物学行为。体内成瘤实验结果证实, 敲低 SMS2 可抑制 TOV-21G 细胞裸鼠移植瘤的生长和瘤组织中 SMS2、 $\beta$ -catenin 蛋白的表达, 提示敲低 SMS2 可能通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制 TOV-21G 细胞的增殖、迁移和侵袭, 诱导细胞凋亡。

综上所述, 敲低 SMS2 表达通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制 OC 细胞 TOV-21G 的恶性生物学行为, 本研究结果表明, SMS2 是抑制 OC 转移的潜在治疗靶点。但 SMS2 在 OC 中的作用及其机制还需进一步研究与验证, 未来将采用其他 OC 细胞对 SMS2 在 OC 中的作用与机制进行深入分析。

#### [参考文献]

- [1] 符圆圆, 郑盼盼, 孔彩霞, 等. HHLA2 及其受体 TMIGD2 在卵巢癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2022, 29(9): 822-827. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.09.006.
- [2] YANG L, XIE H J, LI Y Y, *et al.* Molecular mechanisms of platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer (Review) [J/OL]. *Oncol Rep*, 2022, 47(4): 82[2023-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8908330/>. DOI: 10.3892/or.2022.8293.
- [3] HUANG Y, LIANG S H, XIANG L B, *et al.* miR-218 promoted the apoptosis of human ovarian carcinoma cells *via* suppression of the WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2017, 51(4): 629-636. DOI: 10.7868/S0026898417030065.
- [4] WU X H, ZHANG Y, GUO J P, *et al.* MAC30 knockdown inhibits proliferation and enhance apoptosis of gastric cancer by suppressing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J/OL]. *Gastroenterol Res Pract*, 2020, 2020: 6358685[2023-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7456481/>. DOI: 10.1155/2020/6358685.
- [5] YI Y, LIAO B, ZHENG Z W, *et al.* Downregulation of DEC1 inhibits proliferation, migration and invasion, and induces apoptosis in ovarian cancer cells *via* regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J/OL]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(4): 372[2023-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7903451/>. DOI: 10.3892/etm.2021.9803.
- [6] DENG Z, WANG L J, HOU H L, *et al.* Epigenetic regulation of IQGAP2 promotes ovarian cancer progression *via* activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(1): 153-160. DOI: 10.3892/ijo.2015.3228.
- [7] TANIGUCHI M, OKAZAKI T. Role of ceramide/sphingomyelin (SM) balance regulated through "SM cycle" in cancer[J/OL]. *Cell Signal*, 2021, 87: 110119[2023-08-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34418535/>. DOI: 10.1016/j.cellsig.2021.110119.
- [8] JING F, JING C, DAI X Y, *et al.* Sphingomyelin synthase 2 but not sphingomyelin synthase 1 is upregulated in ovarian cancer and involved in migration, growth and survival *via* different mechanisms [J/OL]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(5): 4412-4421[2023-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8205710/>.
- [9] ZHANG P P, HUA L Y, HOU H, *et al.* Sphingomyelin synthase 2 promotes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced endothelial dysfunction by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J/OL]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(6): 3344-3354[2023-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6202097/>. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3888.
- [10] 章涵, 赵玉霞, 杨惠然, 等. 芒柄花黄素联合下调 miR-4326 对肝癌细胞 HCLM3 生长和侵袭的影响[J]. 中成药, 2022, 44(5): 1636-1640. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.05.049.
- [11] ZHENG K H, CHEN Z T, FENG H Z, *et al.* Sphingomyelin synthase 2 promotes an aggressive breast cancer phenotype by disrupting the homeostasis of ceramide and sphingomyelin[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3): 157[2023-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6377618/>. DOI: 10.1038/s41419-019-1303-0.
- [12] LUO S, PAN Z, LIU S, *et al.* Sphingomyelin synthase 2 overexpression promotes cisplatin-induced apoptosis of HepG2 cells[J/OL]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1): 483-488[2023-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5766058/>. DOI: 10.3892/ol.2017.7309.
- [13] TANIGUCHI M, UEDA Y, MATSUSHITA M, *et al.* Deficiency of sphingomyelin synthase 2 prolongs survival by the inhibition of lymphoma infiltration through ICAM-1 reduction[J]. *FASEB J*, 2020, 34(3): 3838-3854. DOI: 10.1096/fj.201901783RR.
- [14] DENG Y, HU J C, HE S H, *et al.* Sphingomyelin synthase 2 facilitates M2-like macrophage polarization and tumor progression in a mouse model of triple-negative breast cancer[J/OL]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(1): 149-159[2023-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7921660/>. DOI: 10.1038/s41401-020-0419-1.
- [15] SAKAI S, MAKINO A, NISHI A, *et al.* Pathogenic and compensatory mechanisms in epidermis of sphingomyelin synthase 2-deficient mice[J/OL]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2021, 34(5): 246-252[2023-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8410625/>. DOI: 10.1159/000515608.

- [16] ZIETZER A, JAHNEL A L, BULIC M, *et al.* Activation of neutral sphingomyelinase 2 through hyperglycemia contributes to endothelial apoptosis *via* vesicle-bound intercellular transfer of ceramides[J/OL]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 79(1): 48[2023-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8739297/>. DOI: 10.1007/s00018-021-04049-5.
- [17] 杭月, 林昌岫, 黄成日. 神经鞘磷脂合成酶2基因沉默对乳腺癌细胞凋亡的影响[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(8): 1227-1232. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2019.08.008.
- [18] CHEN Y, CAO Y. The sphingomyelin synthase family: proteins, diseases, and inhibitors[J]. *Biol Chem*, 2017, 398(12): 1319-1325. DOI: 10.1515/hsz-2017-0148.
- [19] 武金玉, 张苑珑, 黄明莉, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin 通路在卵巢癌中的调控机制研究进展[J]. *现代妇产科进展*, 2018, 27(4): 311-313, 317. DOI: 10.13283/j.cnki.xdfkjz.2018.04.016.
- [20] DOO D W, MEZA-PEREZ S, LONDOÑO A I, *et al.* Inhibition of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway enhances antitumor immunity in ovarian cancer [J/OL]. *Ther Adv Med Oncol*, 2020, 12: 1758835920913798[2023-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7158255/>. DOI: 10.1177/1758835920913798.
- [21] CAI Y L, HU Y, YU F R, *et al.* AHNAK suppresses ovarian cancer progression through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J/OL]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(20): 23579-23587[2023-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8580348/>. DOI: 10.18632/aging.203473.
- [22] LU Q, QU H, LOU T, *et al.* CK19 promotes ovarian cancer development by impacting on Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J/OL]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13: 2421-2431[2023-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102889/>. DOI: 10.2147/OTT.S242778.

[收稿日期] 2023-08-14

[修回日期] 2023-12-12

[本文编辑] 党瑞山