

## NR2F2 过表达对人卵巢癌 SKOV3 细胞生物学行为的影响

张 硕<sup>1,2</sup>, 夏云秀<sup>1,2</sup>, 陈微微<sup>2</sup>, 董洪亮<sup>2</sup>, 崔冰洁<sup>2</sup>, 刘翠兰<sup>2</sup>, 刘志强<sup>1</sup>, 王 飞<sup>2,3</sup>, 杜 静<sup>1,2</sup>  
(1. 滨州医学院附属医院妇产科, 山东 滨州 256603; 2. 滨州医学院附属医院医学研究中心, 山东 滨州 256603; 3. 山东大学医学融合与实践中心, 山东 济南 250100)

**[摘要]** **目的:** 探讨核受体亚家族 2F 组成员 2 (NR2F2) 对人卵巢癌 SKOV3 细胞生物学行为的影响, 并阐明其分子机制, 为卵巢癌的临床治疗提供新的思路。**方法:** 采用基因表达谱交互分析 (GEPIA) 数据库分析卵巢组织中 NR2F2 基因表达水平, 并分析其与卵巢癌患者临床预后的相关性。将人卵巢癌 SKOV3 细胞分为对照组和 NR2F2 过表达组 (NR2F2 OE 组), 待细胞密度达到 70% 时, 分别转染 mCherry 对照病毒和 NR2F2 OE 过表达病毒, 48 h 后通过嘌呤霉素 (puro) 筛选稳定转染的 SKOV3 细胞系。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法和 Western blotting 法检测 2 组细胞转染效率, RT-qPCR 法检测 2 组细胞中 NR2F2 和性别决定区 Y-box 2 (SOX2) mRNA 表达水平, Western blotting 法检测 2 组细胞中 NR2F2、SOX2、三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 (ABCG2) 和程序性细胞死亡配体 1 (PD-L1) 蛋白表达水平。CCK-8 法检测 2 组细胞增殖活性, 细胞划痕实验检测 2 组细胞迁移率, Transwell 小室实验检测 2 组穿膜细胞数, 成球实验检测 2 组细胞成球数, 外周血单核细胞 (PBMCs) 杀伤肿瘤细胞活性实验检测 2 组存活肿瘤细胞的相对密度, CCK-8 法检测紫杉醇 (PTX) 和卡铂 (CBP) 对 2 组细胞的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ )。**结果:** 与正常卵巢组织比较, 卵巢肿瘤组织中 NR2F2 mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ), 并随卵巢肿瘤临床病理分级提高而降低; NR2F2 mRNA 表达水平较高的患者临床预后较好。成功构建过表达 NR2F2 的 SKOV3 细胞, 与对照组比较, NR2F2 OE 组细胞中 NR2F2 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.001$ ); CCK-8 实验, 与对照组比较, 不同时间点 (1、2、3 和 4 d) NR2F2 OE 组细胞增殖活性均降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 细胞划痕实验, 与对照组比较, NR2F2 OE 组细胞迁移率降低 ( $P < 0.001$ ); Transwell 小室实验, 与对照组比较, NR2F2 OE 组穿膜细胞数减少 ( $P < 0.01$ ); 与对照组比较, NR2F2 OE 组细胞成球数减少 ( $P < 0.05$ ), SKOV3 细胞中 SOX2 mRNA ( $P < 0.01$ ) 和蛋白 ( $P < 0.001$ ) 表达水平均降低; 与对照组比较, NR2F2 OE 组存活肿瘤细胞的相对密度降低, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), PD-L1 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与对照组比较, NR2F2 OE 组细胞增殖活性减弱 ( $P < 0.05$ ), 对 PTX 和 CBP 的药物敏感性增强, PTX 的  $IC_{50}$  明显减小, CBP 的  $IC_{50}$  因其药物浓度过高未能计算; ABCG2 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。**结论:** NR2F2 过表达可抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 降低 SOX2、PD-L1 和 ABCG2 蛋白表达水平, 抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞的干性和免疫逃逸能力, 增强人卵巢癌 SKOV3 细胞对 PTX 和 CBP 的敏感性。

**[关键词]** 核受体亚家族 2F 组成员 2; 卵巢肿瘤; 肿瘤干性; 免疫逃逸; 耐药

**[中图分类号]** R737.31 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2024-03-01 **[录用日期]** 2024-04-14

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (31900441, 82373097); 中国博士后自然科学基金项目 (2023M742089); 山东省科技厅自然科学基金项目 (ZR2019MC026, ZR2023QH080, ZR2022MH305, ZR2022QH192); 山东省卫健委齐鲁卫生与健康杰出青年人才项目 (2020); 山东省科技厅泰山学者青年基金项目 (2021)

**[作者简介]** 张 硕 (1998—), 女, 山东省日照市人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤发生发展治疗机制方面的研究。

**[通信作者]** 杜 静, 研究员 (E-mail: djedith@126.com);

王 飞, 助理研究员 (E-mail: nkuflyking@163.com)

## Effect of over-expression of NR2F2 on biological behaviors of human ovarian cancer SKOV3 cells

ZHANG Shuo<sup>1,2</sup>, XIA Yunxiu<sup>1,2</sup>, CHEN Weiwei<sup>2</sup>, DONG Hongliang<sup>2</sup>, CUI Bingjie<sup>2</sup>, LIU Cuilan<sup>2</sup>,  
LIU Zhiqiang<sup>1</sup>, WANG Fei<sup>2,3</sup>, DU Jing<sup>1,2</sup>

(1. Department of Gynecology, Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou 256603, China;

2. Medical Research Center, Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou 256603, China;

3. Medical Integration and Practice Center, Shandong University, Jinan 250100, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of nuclear receptor subfamily 2 group F member 2 (NR2F2) on the biological behaviors of human ovarian cancer SKOV3 cells, and to clarify its molecular mechanism and provide the new idea for treatment of ovarian cancer. **Methods:** Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) Database analyse the expression level of NR2F2 gene in ovarian tissue, and analyse its correlation with clinical prognosis of ovarian cancer patients. The human ovarian cancer SKOV3 cells were divided into control group and NR2F2 over-expression (NR2F2 OE) group, which were transfected with mCherry control virus and NR2F2 OE over-expression virus, respectively, when the cell density reached 70%, and the stable transfection SKOV3 cell lines were screened with puromycin (puro) 48 h later. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods were used to detect the transfection efficiencies of the cells; RT-qPCR method was used to detect the expression levels of NR2F2 and sex-determining region Y-box 2 (SOX2) mRNA in the cells in two groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of NR2F2, ATP-binding cassette superfamily G member 2 (ABCG2), and programmed cell death 1-ligand 1 (PD-L1) proteins in the cells in two groups. CCK-8 assay was used to detect the proliferation activities of the cells in two groups; Wound assay was used to detect the migration rates of the cells in two groups; Transwell chamber assay was used to detect the number of transmembrane cells; Spheroidization assay was used to detect the numbers of spheroids in the cells; peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)-mediated tumor cell killing assay was used to detect the relative densities of surviving tumor cells; CCK-8 assay was used to detect the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of paclitaxel (PTX) and carboplatin (CBP). **Results:** Compared with normal ovarian tissue, the expression level of NR2F2 gene in ovarian tumor tissue was decreased ( $P < 0.05$ ), and decreased with the improvement of clinical pathological grading of ovarian tumor. The patients with higher expression level of NR2F2 gene had better clinical prognosis. The SKOV3 cells with NR2F2 over-expression were successfully constructed, and the expression levels of NR2F2 mRNA and protein in the cells in NR2F2 OE group were increased compared with control group ( $P < 0.001$ ). The CCK-8 assay results showed that compared with control group, the proliferation activities of the cells in NR2F2 OE group were decreased at different time points (1, 2, 3, and 4 d) ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The cell wound assay results showed that compared with control group, the migration rate of the cells in NR2F2 OE group was decreased ( $P < 0.001$ ). The Transwell assay results showed that compared with control group, the number of transmembrane cells in NR2F2 OE group was decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with control group, the number of the spheroids in NR2F2 OE group was decreased ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of SOX2 mRNA ( $P < 0.01$ ) and protein ( $P < 0.001$ ) were increased. Compared with control group, the relative density of surviving tumor cells in NR2F2 OE group was decreased, but the difference was not significant ( $P < 0.05$ ), and the expression level of PD-L1 protein was decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the proliferation activities of cells in NR2F2 OE group were decreased ( $P < 0.05$ ), and the drug sensitivities of the cells to PTX and CBP were enhanced ( $P < 0.05$ ); the IC<sub>50</sub> of PTX was

significantly reduced, while the  $IC_{50}$  of CBP could not be calculated due to excessively high drug concentration; the expression level of ABCG2 protein was decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The over-expression of NR2F2 may inhibit the proliferation, migration, and invasion of the human ovarian cancer SKOV3 cells, decrease the expression levels of SOX2, PD-L1 and ABCG2 proteins, suppress the stemness and immune evasion ability of the SKOV3 cells, and enhance the sensitivities of the SKOV3 cells to PTX and CBP.

**KEYWORDS** Nuclear receptor subfamily 2 group F member 2; Ovarian neoplasm; Tumor stemness; Immune escape; Drug resistance

卵巢癌是全世界女性面临的一个重要健康问题,其5年生存率较低,仅次于宫颈癌,是妇科恶性肿瘤中的第二大死亡原因<sup>[1]</sup>。多数卵巢癌患者在诊断时已经发展为局部晚期和广泛转移性肿瘤,临床治疗选择有限,临床预后不佳<sup>[2]</sup>。紫杉醇类衍生物或铂类联合减瘤手术是卵巢癌的标准一线治疗策略<sup>[3]</sup>,但其耐药性是限制抗肿瘤化疗效果的主要障碍,通常耐药性的出现导致多数卵巢癌晚期患者的最终复发和死亡,因此寻找新的治疗靶点以及改善卵巢癌患者对药物的敏感性仍然是一项重要的挑战。核受体亚家族2F组成员2(nuclear receptor subfamily 2 group F member 2, NR2F2)是一种由于缺乏已知的天然配体而被归类为孤儿的核受体,国内外研究<sup>[4-6]</sup>发现:NR2F2在多种肿瘤中异常表达,其在肝胆胆囊癌和肾细胞癌等多种肿瘤中发挥一定的抗增殖及抗转移作用。NR2F2被确定为恶性肿瘤干细胞功能的关键调节因子,且与淋巴细胞的生物学行为有关,参与淋巴细胞的激活、分化和免疫效应功能的诱导<sup>[7]</sup>。NR2F2的相对表达水平还与癌细胞对药物的敏感性有关联,可增加乳腺癌细胞对他莫昔芬和抗雌激素药物的敏感性<sup>[8-9]</sup>。上述研究为NR2F2与癌症进展的关联性研究提供了有力证据。NR2F2在卵巢癌中也存在异常表达<sup>[10]</sup>,但是目前关于NR2F2对卵巢癌生物学行为影响的相关研究少有报道。本研究通过构建过表达NR2F2的人卵巢癌SKOV3细胞,探讨NR2F2对人卵巢癌SKOV3细胞生物学行为的影响,为卵巢癌的临床治疗提供新的理论依据和治疗作用靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** 人卵巢癌SKOV3细胞购于美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC),保存于滨州医学院附属医院医学研究中心。胎牛血清购于上海龙田生物科技有限公司,1%青-链霉素双抗购于生工生物工

程(上海)股份有限公司,McCoy's 5a培养基和RPMI 1640培养基购于武汉普诺赛生命科技有限公司, NR2F2 mCherry病毒、NR2F2 OE病毒和促转染试剂 Polybrene 购于广州云舟生物科技股份有限公司,嘌呤霉素(puromycin, puro)、CCK-8试剂盒、紫杉醇(paclitaxel, PTX)和卡铂(carboplatin, CBP)购于美国MCE公司,PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,总RNA提取试剂盒购于美国Omega公司,逆转录试剂盒购于美国Thermo Fisher Scientific公司,实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)试剂盒、人抗CD3抗体和白细胞介素2(interleukin-2, IL-2)购于苏州近岸蛋白有限公司, NR2F2抗体购于武汉爱博泰克生物科技有限公司,性别决定区Y-box 2(sex-determining region Y-box 2, SOX2)抗体和三磷酸腺苷结合转运蛋白G超家族成员2(ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2)抗体购于美国ImmunoWay公司,程序性细胞死亡配体1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)抗体购于美国Proteintech公司,抗 $\alpha$ 微管蛋白( $\alpha$ -Tubulin)抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔抗体(H+L)、HRP标记的山羊抗鼠抗体(H+L)和特超敏增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)即用型底物购于武汉博士德生物工程有限公司,RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒和淋巴细胞分离液购于北京索莱宝生物技术有限公司。CO<sub>2</sub>细胞培养箱(型号: Thermo3541)和生物安全柜(型号: Airstream®A2型)购于新加坡Esco公司,全自动细胞计数仪(型号: IC1000)购于上海睿钰生物科技有限公司,倒置显微镜(型号: CKX53)购于日本Olympus公司,多功能微孔板检测仪(型号: SynergyNeo2)购于美国安捷伦科技有限公司,高速离心机(型号: 400C)购于德国Eppendorf公司, RT-qPCR

仪(型号: CFX Connect)和成像系统(型号: ChemiDocXRS+)购于美国Bio-Rad公司。

**1.2 基因表达谱交互式分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)数据库分析卵巢组织中NR2F2基因表达水平** 采用GEPIA数据库分析NR2F2基因在卵巢正常组织和肿瘤组织中表达水平以及卵巢癌不同临床病理分级中NR2F2基因表达水平;根据Kaplan-Meier Plotter数据库,绘制卵巢癌的无进展生存期(progression-free survival, PFS)曲线,分析NR2F2基因表达水平与卵巢癌患者临床预后的相关性。

**1.3 细胞培养** 人卵巢癌SKOV3细胞培养于含10%胎牛血清和1%青-链霉素的McCoy's 5a培养基中,并置于37℃、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养。

**1.4 细胞转染、稳定转染细胞筛选和细胞分组** 将处于对数生长期的SKOV3细胞进行计数,按照每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞的密度接种于6孔细胞培养板中,培养过夜后细胞密度为70%~90%,设对照组和NR2F2过表达组(NR2F2 OE组),对照组按每孔2 μL转染mCherry对照病毒, NR2F2 OE组按每孔2 μL转染NR2F2 OE过表达病毒,每孔均按照1 mL·L<sup>-1</sup>加入促转染试剂Polybrene, 1 mL·L<sup>-1</sup> puromycin用于抗生素筛选,培养5 d,以获得稳定转染的细胞株。

**1.5 RT-qPCR法检测2组细胞中NR2F2和SOX2 mRNA表达水平** 收集对照组和NR2F2 OE组细胞沉淀,参照说明书,使用总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA,逆转录合成cDNA作为qPCR模板,根据SYBR Green荧光定量试剂盒说明书进行荧光定量扩增,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为对照平行扩增,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算各组细胞中目的基因表达水平。引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Tab. 1 Primer sequences of PCR

Gene	Primer sequence
GAPDH	F: 5'-CGGATTTGGTCGTATTGGG-3'
	R: 5'-TCTCGCTCTGGAAGATGG-3'
NR2F2	F: 5'-TGCCTGTGGTCTCTCTGATG-3'
	R: 5'-ATATCCCGGATGAGGGTTTC-3'
SOX2	F: 5'-GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAGA-3'
	R: 5'-TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGG-3'

**1.6 Western blotting法检测2组细胞中NR2F2、SOX2、ABCG2和PD-L1蛋白表达水平** 离心收集细胞沉淀,使用含有苯甲磺酰氟的RIPA裂解缓冲液在冰上裂解30 min, 12 700 r·min<sup>-1</sup>离心15 min后,收集上清液,应用BCA试剂盒测定蛋白质浓度。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白质,并转移到聚二偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,5%的脱脂牛奶室温封闭1 h后,将膜与相应的一抗(1:1 000稀释度)在4℃下孵育过夜,经TBST溶液洗剂后,在37℃下与二抗(1:2 000稀释度)孵育2 h,经TBST溶液洗剂后,加入ECL显影液进行显影,平行使用α-Tubulin抗体作为内部对照。采用Image J软件进行灰度识别,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/内参蛋白条带灰度值。

**1.7 CCK-8法检测2组细胞增殖活性** 对照组和NR2F2 OE组SKOV3细胞计数后,按每孔 $3 \times 10^3$ 个细胞的密度接种于96孔细胞培养板中,每组设6个复孔,于0、1、2、3和4 d每孔加入10 μL CCK-8溶液,37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中避光孵育2 h,酶标仪检测波长450 nm处的吸光度(A)值,计算各组细胞增殖活性。细胞增殖活性=(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值)×100%。绘制随时间变化的细胞生长曲线。

**1.8 细胞划痕实验检测2组细胞迁移率** 对照组和NR2F2 OE组SKOV3细胞计数后,按每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞的密度接种于12孔细胞培养板中,每组设3个复孔,待细胞长满后,200 μL枪头按十字方向轻划细胞,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗3次,采用倒置显微镜下拍照记录0 h时的划痕距离(L<sub>0</sub>),48 h后在同一位置再次拍照记录划痕距离(L<sub>1</sub>),计算细胞迁移率。细胞迁移率=(L<sub>0</sub>-L<sub>1</sub>)/L<sub>0</sub>×100%。

**1.9 Transwell小室实验检测2组穿膜细胞数** 对照组和NR2F2 OE组SKOV3细胞计数后,Transwell小室装置置于24孔细胞培养板中,分别往上室和下室中加入200 μL含 $1 \times 10^4$ 个细胞的无血清McCoy's 5a培养基及800 μL含20%胎牛血清的McCoy's 5a培养基,于37℃恒温、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。孵育72 h后,PBS缓冲液冲洗1次,4%多聚甲醛固定15 min,PBS缓冲液再次冲洗1次,

然后用结晶紫染色2 h,再用PBS缓冲液冲洗3次,用棉棒擦除上室中未穿膜的细胞,采用倒置显微镜下拍照,统计穿膜的细胞数。实验重复3次,每次选取3个视野拍照,求平均值,根据3次重复实验结果统计作图。

**1.10 成球实验检测2组细胞成球数** 无血清的McCoy's 5a培养基重悬对照组和NR2F2 OE组SKOV3细胞,计数后按每孔3 000个细胞的密度接种于12孔细胞培养板中,每组设3个复孔,每孔加入 $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、 $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)和50×B27,于37℃恒温、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,诱导细胞成球。2周后,采用倒置显微镜下拍照,观察成球情况并统计直径大于50 μm的成球数。

**1.11 外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)杀伤肿瘤细胞活性实验检测2组存活肿瘤细胞的相对密度** 使用淋巴细胞分离液,从健康人群的外周血中分离纯化PBMCs,保存在含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,然后用 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的人抗CD3抗体和 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的IL-2激活PBMCs。对照组和NR2F2 OE组SKOV3细胞计数后,按每孔 $1\times 10^4$ 个细胞接种于12孔细胞培养板中,细胞培养过夜后,将活化的PBMCs按每孔 $4\times 10^4$ 个细胞的密度加入接种有贴壁SKOV3细胞的12孔细胞培养板中。PBMCs和SKOV3细胞共培养10 d。弃去上清液,采用PBS缓冲液洗涤贴壁细胞3次,随后用4%多聚甲醛固定并用结晶紫染色。采用倒置荧光显微镜和DP73彩色相机获得光学图像,采用Image J软件进行处理分析,统计光学图像的光密度,代表存活肿瘤细胞的相对密度。

**1.12 CCK-8法检测PTX和CBP对2组细胞的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)值** 对照组和NR2F2 OE组的SKOV3细胞计数后,按每孔 $3\times 10^3$ 个/100 μL接种于96孔细胞培养板中,每组设6个复孔,于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜,12~24 h内加药,PTX设6个浓度梯度(0、2.5、5、10、50和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),CBP设5个浓度梯度(0、3、6、9和 $12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),培养48 h后,每孔加入10 μL CCK-8溶液,避光孵育2 h,酶标仪检测波长450 nm处的A值,计算各组细胞增殖活性,细胞增殖活性=(实验组A值-空

白组A值)/(对照组A值-空白组A值)×100%。计算PTX和CBP对2组细胞的IC<sub>50</sub>值。

**1.13 统计学分析** 采用GraphPad Prism 8.0.1统计软件进行统计学分析。2组细胞中NR2F2和SOX2 mRNA表达水平,各组细胞中NR2F2、SOX2、PD-L1和ABCG2蛋白表达水平,2组细胞增殖活性、细胞迁移率、穿膜细胞数、成球数和存活肿瘤细胞的相对密度,均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2组间样本均数比较采用两独立样本 $t$ 检验,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LSD- $t$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 在正常卵巢组织和卵巢肿瘤组织中NR2F2 mRNA表达水平及其与患者预后的相关性

GEPIA数据库分析结果显示:与正常卵巢组织比较,卵巢肿瘤组织中NR2F2 mRNA表达水平降低( $P<0.05$ ) (图1A),并且随着卵巢肿瘤临床病理分级的提高, NR2F2 mRNA表达水平降低(图1B)。Kaplan-Meier Plotter数据库的PFS分析结果显示: NR2F2 mRNA表达水平较高的患者临床预后较好(图1C)。

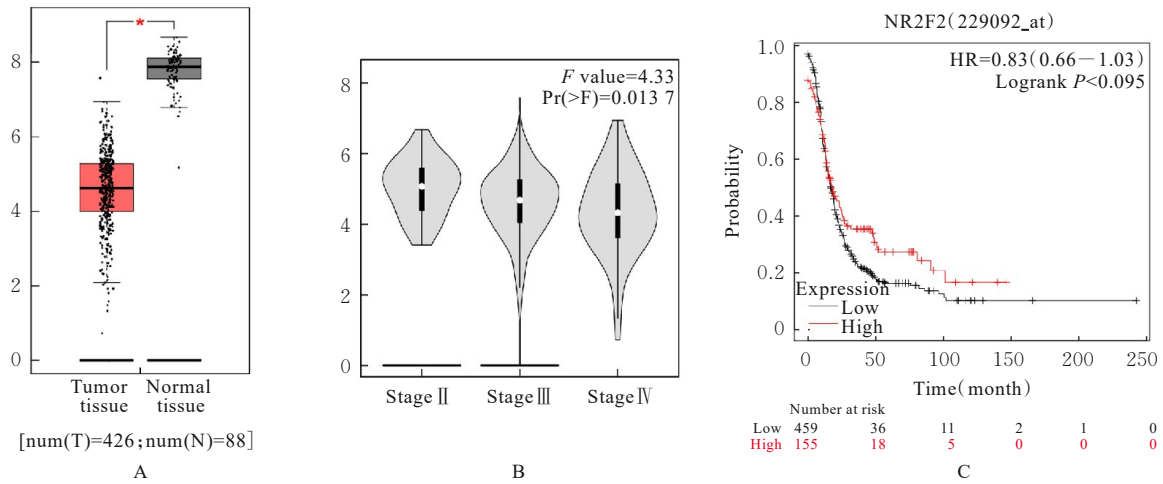
**2.2 NR2F2过表达病毒转染的效果** 与对照组( $1.00\% \pm 0.01\%$ 和 $1.00\% \pm 0.37\%$ )比较, NR2F2 OE组NR2F2 mRNA ( $12.20\% \pm 1.28\%$ )和蛋白( $24.25\% \pm 0.57\%$ )表达水平均明显升高( $P<0.001$ ),表明NR2F2过表达成功。见图2。

**2.3 2组细胞增殖活性** 与对照组( $1.00 \pm 2.00$ 、 $3.00 \pm 2.20$ 、 $5.20 \pm 3.53$ 和 $8.72 \pm 2.18$ )比较,不同时间点(1、2、3和4 d) NR2F2 OE组SKOV3细胞增殖活性( $1.00 \pm 1.04$ 、 $2.04 \pm 1.23$ 、 $3.27 \pm 2.54$ 和 $5.81 \pm 0.72$ )均降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。见图3。

**2.4 2组细胞迁移率** 与对照组( $49.94\% \pm 3.12\%$ )比较, NR2F2 OE组SKOV3细胞迁移率( $25.00\% \pm 1.35\%$ )降低( $P<0.001$ )。见图4。

**2.5 2组穿膜细胞数** 与对照组(248.70个±22.05个)比较, NR2F2 OE组SKOV3细胞的穿膜细胞数(93.67个±30.73个)减少( $P<0.01$ )。见图5。

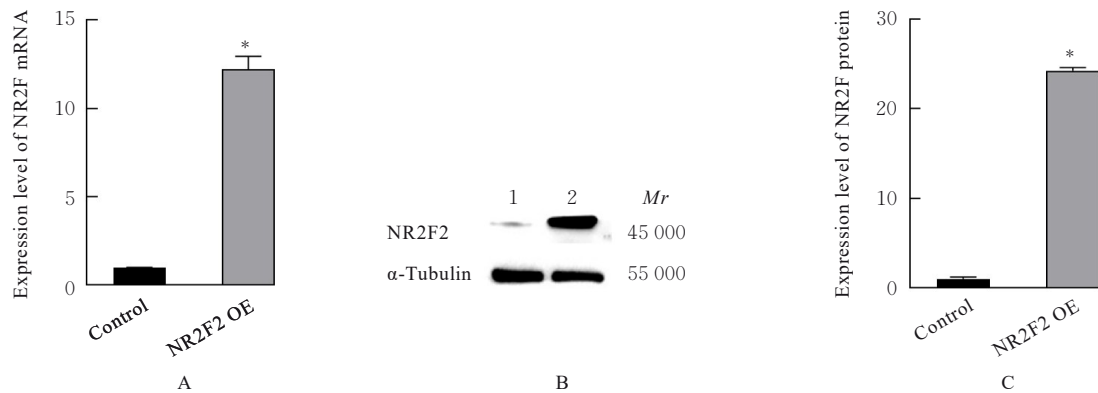
**2.6 2组细胞成球数及SKOV3细胞中SOX mRNA和蛋白表达水平** 成球实验检测结果显示:与对照组( $37.00$ 个± $6.93$ 个)比较, NR2F2 OE组



A: Comparison of the expression levels of NR2F2 between normal ovarian tissue and tumor tissue; B: Expression levels of NR2F2 in different clinicopathologic grades of ovarian tumors; C: Correlation between the expression level of NR2F2 and the clinical prognosis in ovarian cancer patients; \* $P < 0.05$ .

图1 正常卵巢组织和卵巢肿瘤组织中NR2F2 mRNA表达水平及其与患者临床预后的相关性

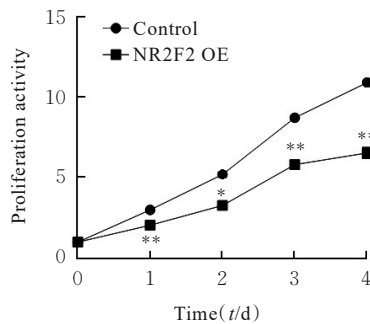
Fig. 1 Expression levels of NR2F2 mRNA in normal ovarian tissue ovarian tumor tissue and its correlation with clinical prognosis in patients



A: Expression of NR2F2 mRNA in SKOV3 cells; B: Electrophoregram of expression of NR2F2 protein in SKOV3 cells (Lane 1: Control group; Lane 2: NR2F2 OE group); C: Histogram of expression of NR2F2 protein in SKOV3 cells (\* $P < 0.001$  vs control group).

图2 NR2F2过表达病毒转染的效果

Fig. 2 Effect of transfection of NR2F2 over-expression virus



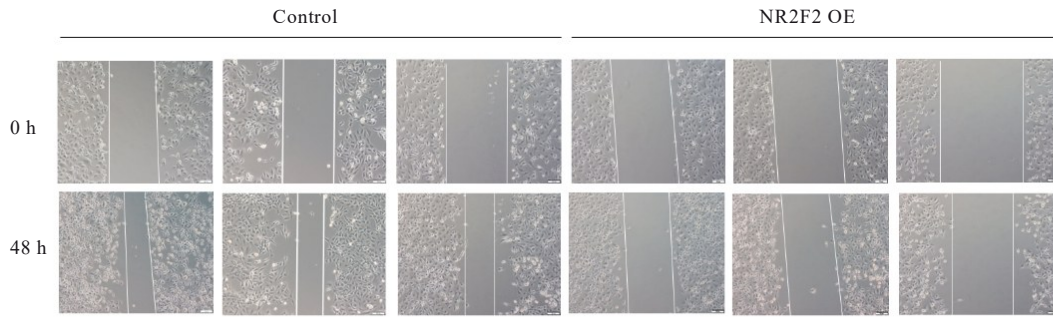
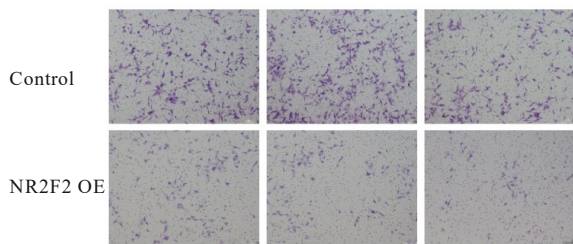
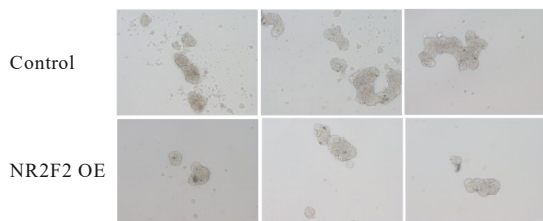
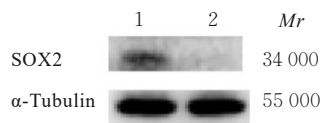
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group.

图3 2组细胞增殖活性

Fig. 3 Proliferation activities of cells in two groups

SKOV3细胞诱导产生的球体数量(17.00个±5.29个)减少( $P < 0.05$ ),见图6。RT-qPCR和Western blotting实验检测结果显示:与对照组(1.00%±0.10%和1.00%±0.03%)比较, NR2F2 OE组SKOV3细胞中SOX2 mRNA(0.52%±0.02%)和蛋白(0.04%±0.00%)表达水平均降低( $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ )。见图7。

2.7 2组存活肿瘤细胞的相对密度和SKOV3细胞中PD-L1蛋白表达水平 PBMCs杀伤肿瘤细胞活性实验检测结果显示:与对照组(1.00%±0.11%)比较, NR2F2 OE组存活SKOV3细胞的

图4 细胞划痕实验检测2组细胞迁移情况( $\times 10$ )Fig. 4 Migration of cells in two groups detected by cell wound assay( $\times 10$ )图5 Transwell小室实验检测2组细胞迁移情况(结晶紫, $\times 10$ )Fig. 5 Migration of cells in two groups detected by Transwell chamber assay(Crystal violet, $\times 10$ )图6 2组细胞的成球情况( $\times 20$ )Fig. 6 Spheroids status of cells in two groups( $\times 20$ )

Lane 1: Control group; Lane 2: NR2F2 OE group.

图7 2组SKOV3细胞中SOX2蛋白表达电泳图

Fig. 7 Electrophoregram of expression of SOX2 protein in SKOV3 cells in two groups

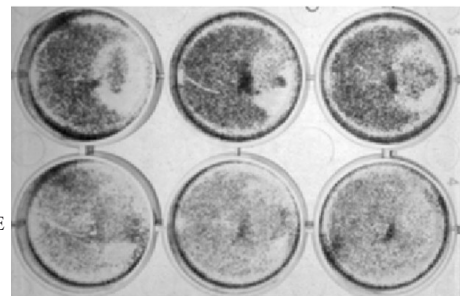


图8 2组存活肿瘤细胞的相对密度(结晶紫)

Fig. 8 Relative densities of survival tumor cells in two groups(Crystal violet)



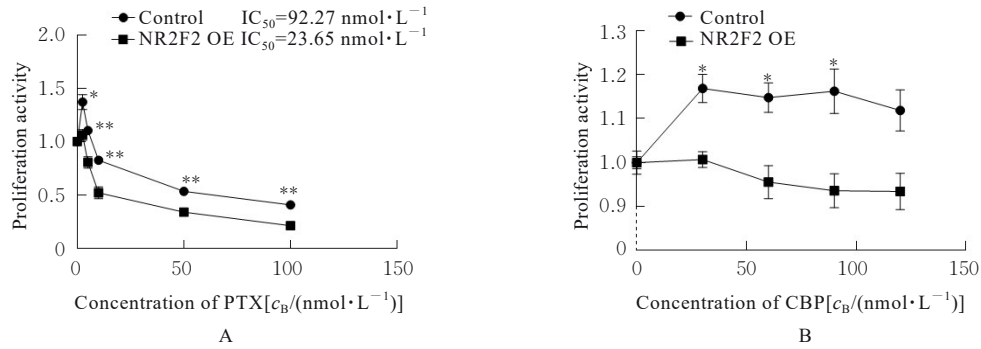
Lane 1: Control group; Lane 2: NR2F2 OE group.

图9 2组SKOV3细胞中PD-L1蛋白表达电泳图

Fig. 9 Electrophoregram of expressions of PD-L1 protein in SKOV3 cells in two groups

相对密度 ( $0.82\% \pm 0.13\%$ ) 降低, 但差异无统计学意义 ( $P=0.152$ )。见图8。Western blotting法检测结果显示: 与对照组 ( $1.00\% \pm 0.25\%$ ) 比较, NR2F2 OE组SKOV3细胞的PD-L1蛋白表达水平 ( $0.44\% \pm 0.15\%$ ) 降低 ( $P<0.05$ )。见图9。

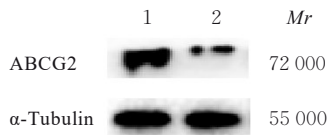
2.8 PTX和CBP对2组细胞的 $IC_{50}$ 值及SKOV3细胞中ABCG2蛋白表达水平 CCK-8法检测结果显示: 与对照组 ( $0.87 \pm 0.36$ 和 $1.12 \pm 0.07$ ) 比较, NR2F2 OE组SKOV3细胞增殖活性 ( $0.66 \pm 0.35$ 和 $0.97 \pm 0.03$ ) 减弱 ( $P<0.05$ ), 对PTX和CBP的药物敏感性增加, 对照组和NR2F2 OE组PTX的 $IC_{50}$ 值分别为 $92.27$ 及 $23.65 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , CBP的 $IC_{50}$ 值过高未能计算, 见图10。Western blotting法检测结果显示: 与对照组 ( $1.00\% \pm 0.15\%$ ) 比较, NR2F2 OE组SKOV3细胞中ABCG2蛋白表达水平 ( $0.49\% \pm 0.20\%$ ) 降低 ( $P<0.05$ )。见图11。



A: PTX; B: CBP. \* $P < 0.05$  vs control group.

图 10 PTX 和 CBP 对 2 组细胞的 IC<sub>50</sub> 值

Fig. 10 IC<sub>50</sub> values of PTX and CBP on cells in two groups



Lane 1: Control group; Lane 2: NR2F2 OE group.

图 11 2 组 SKOV3 细胞中 ABCG2 蛋白表达电泳图

Fig. 11 Electrophoregram of expressions of ABCG2 protein in SKOV3 cells in two groups

### 3 讨论

卵巢癌作为女性生殖系统三大恶性肿瘤之一, 尽管减瘤手术、化疗联合、靶向药物和免疫治疗取得了快速进展, 但卵巢癌患者病死率仍居高不下<sup>[11]</sup>。NR2F2在人类机体各组织中均有广泛的表达, 其表达和转录活性的改变与不孕症、血管系统异常及糖尿病等代谢疾病存在密切关联<sup>[12]</sup>, 但在不同肿瘤中的差异表达具有种属和组织特异性。研究<sup>[13]</sup>显示: 在前列腺癌中, NR2F2表达上调, 转录水平与肿瘤大小、早期浸润和转移存在密切关联, 与患者总生存期和无疾病进展期等预后指标呈负相关关系。研究<sup>[14]</sup>显示: 在胃癌中, NR2F2低表达, 促进癌细胞的肝转移, 明显降低胃癌患者的总生存率。本研究结果显示: NR2F2在卵巢癌中低表达, 其表达水平与卵巢癌患者的阳性预后呈正相关关系, 具有作为药物靶点的潜力。NR2F2与肿瘤的进展有紧密关联, 但是关于NR2F2在卵巢癌中的作用及其机制未见相关报道。本研究通过构建过表达NR2F2的人卵巢癌SKOV3细胞, 探讨NR2F2对卵巢癌细胞生物学行为的影响, 为卵巢癌的治疗寻找新的靶点。

在恶性皮肤鳞状细胞癌中NR2F2可促进癌细

胞的增殖、上皮-间充质转化和侵袭, 并维持癌细胞的干性<sup>[7]</sup>, 还可通过增加结直肠癌细胞中肿瘤蛋白p53以及磷酸酶和紧张素同系物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)的表达并减少蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)的磷酸化抑制癌细胞的增殖及侵袭<sup>[15]</sup>。本研究结果显示: 过表达NR2F2后, 人卵巢癌SKOV3细胞的增殖能力、迁移侵袭能力和干性均明显减弱, 表明NR2F2可能通过抑制细胞的增殖、迁移、侵袭和干性在卵巢癌中发挥重要作用。肿瘤干细胞可以驱动肿瘤的起始导致肿瘤的复发<sup>[16]</sup>, 其不仅具有致癌性, 还可以促进化疗耐药性的出现<sup>[17]</sup>。SOX2是一种干细胞转录因子, 是肿瘤干细胞自我更新能力和多项分化潜能的关键调节因子<sup>[18]</sup>。以往研究表明: SOX2可促进结直肠癌细胞中的干细胞样特性<sup>[19]</sup>, 也可以诱导胶质母细胞瘤中的肿瘤细胞干性<sup>[20]</sup>, 表明SOX2与肿瘤干性的维持存在密切关联。本研究中, 过表达NR2F2后, 人卵巢癌SKOV3细胞中SOX2 mRNA和蛋白表达水平降低, 表明NR2F2可通过负向调控SOX2减弱人卵巢癌SKOV3细胞的干性。

在癌症免疫周期中, 癌抗原被树突状细胞识别呈递以进行T淋巴细胞启动, 激活的T淋巴细胞浸润到癌细胞中, 特异性结合癌细胞, 发挥抗癌免疫反应<sup>[21]</sup>, 然而肿瘤可以通过多种逃逸机制逃避免疫识别, NR2F2可通过调节小鼠和人恶性皮肤鳞状细胞癌中的常见转录程序来抑制肿瘤分化及免疫细胞浸润, 逃避免疫反应<sup>[7]</sup>。本研究中, 过表达NR2F2后, 人卵巢癌SKOV3细胞的免疫逃逸能力降低, 表明过表达NR2F2能够抑制人卵巢癌SKOV3细胞的免疫逃逸, 促进T淋巴细胞对癌细胞的杀伤作用。PD-L1是表达在肿瘤细胞表面的一

种配体,可与T淋巴细胞表面表达的程序性死亡受体1(programmed cell death protein-1, PD-1)结合,抑制T淋巴细胞反应,从而使肿瘤细胞逃避机体免疫系统的攻击而存活下来,因此基于PD-L1通路在癌症免疫治疗中具有重要价值,发挥着抗肿瘤增强作用,包括黑色素瘤、非小细胞肺癌和肾细胞癌等<sup>[22-23]</sup>。增加PD-L1的丰度可诱导乳腺癌的免疫逃逸<sup>[24]</sup>,也可促进胃癌细胞从免疫监视中逃逸<sup>[25]</sup>。卵巢癌对免疫治疗的反应有限,然而涉及肿瘤生物标志物PD-L1的新型疗法和研究设计,增加了卵巢癌免疫疗法成功的可能性<sup>[26]</sup>。PD-L1在卵巢癌中高表达,使用免疫检查点抑制剂抑制PD-L1可下调已知与卵巢癌复发相关的干细胞群<sup>[27]</sup>。本研究中,过表达NR2F2后,人卵巢癌SKOV3细胞中PD-L1蛋白表达水平降低,表明NR2F2可通过负向调控PD-L1抑制人卵巢癌SKOV3细胞的免疫逃逸能力,发挥抗癌免疫反应。

肿瘤化疗中多药耐药性的发展也是癌症治疗的主要挑战,近年来PTX和CBP疗效的减弱或消失对卵巢癌患者的生存时间及质量有重大影响,因此寻找克服其耐药的策略成为进一步扩大PTX和CBP获益人群的迫切需求。研究<sup>[10]</sup>表明:降低NR2F2的表达后,可以提高三阴性乳腺癌细胞对PTX等微管破坏药物的敏感性。本研究中,过表达NR2F2后,人卵巢癌SKOV3细胞对PTX和CBP的敏感性增强,表明过表达NR2F2可以改善人卵巢癌SKOV3细胞对PTX和CBP的耐药性,提高疗效。ABCG2是通过促进化疗药物外排,参与癌细胞多药耐药的主要ABC转运蛋白<sup>[28]</sup>。研究<sup>[29]</sup>显示:三阴性乳腺癌细胞中的PTX耐药性归因于ABCG2的上调,新型紫杉烷有效诱导微管蛋白/微管聚合和G<sub>2</sub>/M期阻滞,导致PTX敏感和PTX耐药癌细胞凋亡,细胞外基质分子透明质酸抑制剂——4-甲基乌贝利酮通过降低ABCG2的表达克服卵巢癌对CBP的耐药性<sup>[30]</sup>。本研究中,过表达NR2F2后,人卵巢癌SKOV3细胞中ABCG2蛋白的表达水平降低,表明NR2F2可通过负向调控ABCG2来增强人卵巢癌SKOV3细胞对PTX和CBP的敏感性,提高卵巢癌患者的临床疗效。

综上所述,过表达NR2F2可以抑制人卵巢癌SKOV3细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并通过负向调控SOX2、PD-L1和ABCG2蛋白表达,抑制人卵巢癌SKOV3细胞的干性、免疫逃逸能力以及

增强人卵巢癌SKOV3细胞对PTX和CBP的敏感性,本研究结果为改善卵巢癌的临床治疗提供了理论依据,发现了NR2F2调控人卵巢癌SKOV3细胞多种生物学行为的多个作用靶点,但实验尚停留在细胞实验层面,未在动物体内实验中得到进一步验证,具体的机制也有待进一步的深入研究。

#### 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:

张硕参与整体实验、统计学分析及论文撰写,夏云秀、陈微微、董洪亮、崔冰洁、刘翠兰和刘志强参与实验及论文审阅,王飞和杜静参与实验设计及论文修改。

#### [参考文献]

- [1] YU P, WANG Y R, YUAN D H, et al. Vascular normalization: reshaping the tumor microenvironment and augmenting antitumor immunity for ovarian cancer [J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1276694.
- [2] JIANG Y T, WANG C D, ZHOU S T. Targeting tumor microenvironment in ovarian cancer: premise and promise [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(2):188361.
- [3] TIAN W J, LEI N J, ZHOU J Y, et al. Extracellular vesicles in ovarian cancer chemoresistance, metastasis, and immune evasion [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(1):64.
- [4] YUN S H, PARK J I. Recent progress on the role and molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II in cancer [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(4):300060520919236.
- [5] LANG Q F, XIAO P, ZHAO M, et al. COUP-TF II promotes metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition through upregulating Snail in human intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2020, 52(11):1247-1256.
- [6] FANG X, LIU C X, ZENG X R, et al. Orphan nuclear receptor COUP-TF II is an oncogenic gene in renal cell carcinoma [J]. *Clin Transl Oncol*, 2020, 22(5):772-781.
- [7] MAURI F, SCHEPKENS C, LAPOUGE G, et al. NR2F2 controls malignant squamous cell carcinoma state by promoting stemness and invasion and repressing differentiation [J]. *Nat Cancer*, 2021, 2(11):1152-1169.
- [8] RIGGS K A, WICKRAMASINGHE N S, COCHRUM R K, et al. Decreased chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II expression in

- tamoxifen-resistant breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(20):10188-10198.
- [9] AL-RAYYAN N, LITCHFIELD L M, IVANOVA M M, et al. 5-Aza-2-deoxycytidine and trichostatin A increase COUP-TFII expression in antiestrogen-resistant breast cancer cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2014, 347(1): 139-150.
- [10] SAFE S, JIN U H, HEDRICK E, et al. Minireview: role of orphan nuclear receptors in cancer and potential as drug targets [J]. *Mol Endocrinol*, 2014, 28(2):157-172.
- [11] ARMSTRONG D K, ALVAREZ R D, BACKES F J, et al. NCCN guidelines<sup>®</sup> insights: ovarian cancer, version 3.2022 [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2022, 20(9):972-980.
- [12] POLVANI S, PEPE S, MILANI S, et al. COUP-TFII in health and disease [J]. *Cells*, 2019, 9(1):101.
- [13] WANG L M, CHENG C M, QIN J, et al. Small-molecule inhibitor targeting orphan nuclear receptor COUP-TFII for prostate cancer treatment [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(18): eaaz8031.
- [14] DING W J, ZHANG Y D, CAI H L, et al. Overexpression of COUP-TFII suppresses proliferation and metastasis of human gastric cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2):2393-2401.
- [15] YUN S H, PARK J I. Coup-TF II overexpression inhibits cell proliferation and invasion via increased expression of p53 and pten and decreased Akt phosphorylation in human colorectal cancer SNU-C4 cells [J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(2):767-777.
- [16] COOPER J, GIANCOTTI F G. Integrin signaling in cancer: mechanotransduction, stemness, epithelial plasticity, and therapeutic resistance [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(3):347-367.
- [17] HUANG T Z, SONG X, XU D D, et al. Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance [J]. *Theranostics*, 2020, 10(19):8721-8743.
- [18] MIRZAEI S, PASKEH M D A, ENTEZARI M, et al. SOX2 function in cancers: Association with growth, invasion, stemness and therapy response [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2022, 156:113860.
- [19] ZHU Y, HUANG S M, CHEN S Y, et al. SOX2 promotes chemoresistance, cancer stem cells properties, and epithelial-mesenchymal transition by  $\beta$ -catenin and Beclin1/autophagy signaling in colorectal cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(5):449.
- [20] LOPEZ-BERTONI H, JOHNSON A, RUI Y, et al. Sox2 induces glioblastoma cell stemness and tumor propagation by repressing TET2 and deregulating 5hmC and 5mC DNA modifications [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):37.
- [21] TANG S, NING Q, YANG L, et al. Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 86:106700.
- [22] LEI Q Y, WANG D, SUN K, et al. Resistance mechanisms of anti-PD1/PDL1 therapy in solid tumors [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:672.
- [23] KORNEPATI A V R, VADLAMUDI R K, CURIEL T J. Programmed death ligand 1 signals in cancer cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(3):174-189.
- [24] FANG W L, ZHOU T, SHI H, et al. Progranulin induces immune escape in breast cancer via up-regulating PD-L1 expression on tumor-associated macrophages (TAMs) and promoting CD8<sup>+</sup> T cell exclusion [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1):4.
- [25] MA X X, JIA S Q, WANG G J, et al. TRIM28 promotes the escape of gastric cancer cells from immune surveillance by increasing PD-L1 abundance [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1):246.
- [26] MORAND S, DEVANABOYINA M, STAATS H, et al. Ovarian cancer immunotherapy and personalized medicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12):6532.
- [27] ALWOSAIBAI K, AALMRI S, MASHHOUR M, et al. PD-L1 is highly expressed in ovarian cancer and associated with cancer stem cells populations expressing CD44 and other stem cell markers [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1):13.
- [28] MOINUL M, AMIN S A, JHA T, et al. Updated chemical scaffolds of ABCG2 inhibitors and their structure-inhibition relationships for future development [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 241:114628.
- [29] RONG D D, WANG C W, ZHANG X M, et al. A novel taxane, difluorovinyl-ortataxel, effectively overcomes paclitaxel-resistance in breast cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2020, 491:36-49.
- [30] LOKMAN N A, PRICE Z K, HAWKINS E K, et al. 4-methylumbelliferone inhibits cancer stem cell activation and overcomes chemoresistance in ovarian cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(8):1187.