

[文章编号] 1671-587X(2025)06-1709-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250628

## SPHK1过表达慢病毒载体的构建和稳定转染SKOV3细胞系的建立

苏秋源<sup>1</sup>, 赵玲<sup>1</sup>, 谭佳佳<sup>1</sup>, 莫世恩<sup>1</sup>, 周海琴<sup>1</sup>, 卢芳芳<sup>1</sup>, 韦依<sup>1</sup>, 周洋<sup>1</sup>, 况燕<sup>1,2</sup>

(1. 广西医科大学第一附属医院妇科, 广西南宁 530021; 2. 广东省广州市第一人民医院妇科, 广东广州 510180)

**[摘要]** **目的:** 构建鞘氨醇激酶1 (SPHK1) 过表达慢病毒载体, 建立SKOV3慢病毒稳定转染细胞系。**方法:** 根据美国生物技术信息中心 (NCBI) 数据库提供的SPHK1的数据信息设计并合成引物, 扩增目的基因, 连接至经 *Bam*H I 和 *Age* I 限制性内切酶处理的GV492质粒, 构建SPHK1过表达慢病毒载体, 选取阳性克隆进行PCR和测序鉴定。将慢病毒质粒和慢病毒包装辅助质粒共同转染至HEK-293T细胞进行包装和滴度测定。根据测得的最佳感染复数 (MOI) 为10, 将各组相应的慢病毒量转染至SKOV3细胞, 分为空白组 (不进行处理)、GV492对照组 (GV492对照慢病毒感染SKOV3细胞) 和GV492-SPHK1过表达组 (GV492-SPHK1过表达慢病毒感染SKOV3细胞, *ov*-SPHK1组)。使用最佳浓度为  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的嘌呤霉素筛选稳定转染的SKOV3细胞系, 48 h后换液, 更换浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  嘌呤霉素筛选14 d, 荧光显微镜下观察细胞形态和荧光表达情况。采用实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 法检测各组SKOV3细胞中 *SPHK1* mRNA表达水平, Western blotting法检测各组SKOV3细胞中SPHK1蛋白表达水平。**结果:** PCR测序, SPHK1过表达慢病毒载体基因序列与目标序列完全一致, 成功构建SPHK1过表达慢病毒载体, GV492对照组和 *ov*-SPHK1组慢病毒滴度分别为  $5 \times 10^{11}$  及  $8 \times 10^{11} \text{ TU} \cdot \text{L}^{-1}$ 。GV492对照组和 *ov*-SPHK1组SKOV3细胞状态良好, 荧光表达强烈, 提示成功构建SPHK1过表达的SKOV3稳定转染细胞系。RT-qPCR法检测, 与空白组和GV492对照组比较, *ov*-SPHK1组SKOV3细胞中 *SPHK1* mRNA表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ )。Western blotting法检测, 与空白组和GV492对照组比较, *ov*-SPHK1组SKOV3细胞中SPHK1蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ )。**结论:** 成功构建了SPHK1过表达慢病毒载体, 并建立了稳定转染的SKOV3细胞。

**[关键词]** 鞘氨醇激酶1; SKOV3细胞; 慢病毒; 稳定转染细胞系; 卵巢肿瘤

**[中图分类号]** R392 **[文献标志码]** A

## Construction of SPHK1 overexpression lentiviral vectors and establishment of stable transfected SKOV3 cell lines

SU Qiuyuan<sup>1</sup>, ZHAO Ling<sup>1</sup>, TAN Jiajia<sup>1</sup>, MO Shien<sup>1</sup>, ZHOU Haiqin<sup>1</sup>, LU Fangfang<sup>1</sup>, WEI Yi<sup>1</sup>,  
ZHOU Yang<sup>1</sup>, KUANG Yan<sup>1,2</sup>

(1. Department of Gynecology, First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Department of Gynecology, First People's Hospital, Guangzhou City, Guangdong Province, Guangzhou 510180, China)

[收稿日期] 2025-01-12 [录用日期] 2025-02-22

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82260566, 81960466)

[作者简介] 苏秋源 (1998—), 女, 广西壮族自治区钦州市人, 在读硕士研究生, 主要从事妇科肿瘤的诊断和治疗方面的研究。

[通信作者] 况燕, 教授, 硕士研究生导师 (E-mail: kuangyan\_2004@163.com)

© 《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

**ABSTRACT Objective:** To construct the sphingosine kinase 1 (SPHK1) overexpression lentiviral vector, and to establish the SKOV3 lentiviral stable transfection cell line. **Methods:** According to the SPHK1 data information provided by the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database, the primers were designed and synthesized, the target gene was amplified, and connected to the GV492 plasmid treated with *BamH* I and *Age* I restriction enzymes to construct the SPHK1 overexpression lentiviral vector; the positive clones were selected for PCR and sequencing identification; the lentiviral plasmid and the lentiviral packaging auxiliary plasmid were co-transfected into the HEK-293T cells for packaging and titer determination; according to the measured optimal multiplicity of infection (MOI) of 10, the corresponding lentiviral amounts in various groups were transfected into the SKOV3 cells, and the SKOV3 cells were divided into blank group (without treatment), GV492 control group (GV492 control lentivirus infected SKOV3 cells), and GV492-SPHK1 overexpression group (GV492-SPHK1 overexpression lentivirus infected SKOV3 cells, ov-SPHK1 group); the optimal concentration of  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  puromycin was used to screen the stably transfected SKOV3 cell line; after 48 h, the medium was changed and replaced with  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  puromycin for screening for 14 d; the morphology and fluorescence expression of the cells were observed under fluorescence microscope; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of *SPHK1* mRNA in the SKOV3 cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression level of SPHK1 protein in the SKOV3 cells in various groups. **Results:** The PCR sequencing results showed that the gene sequence of the SPHK1 overexpression lentiviral vector was completely consistent with the target sequence, and the SPHK1 overexpression lentiviral vector was successfully constructed; the titer determination results showed that the lentiviral titers in GV492 control group and ov-SPHK1 group were  $5 \times 10^{11}$  and  $8 \times 10^{11} \text{ TU} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively; the SKOV3 cells in GV492 control group and ov-SPHK1 group were in good state and showed strong fluorescence expression, suggesting that the SKOV3 stable transfection cell line overexpressing SPHK1 was successfully established; the RT-qPCR results showed that compared with blank group and GV492 control group, the expression level of SPHK1 mRNA in the SKOV3 cells in ov-SPHK1 group was significantly increased ( $P < 0.01$ ); the Western blotting results showed that compared with blank group and GV492 control group, the expression level of SPHK1 protein in the SKOV3 cells in ov-SPHK1 group was significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The SPHK1 overexpression lentiviral vector is successfully constructed, and the SKOV3 stable transfection cell line is established.

**KEYWORDS** Sphingosine kinase 1; SKOV3 cells; Lentivirus; Stable transfection cell line; Ovarian neoplasms

卵巢癌是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,因无有效筛查手段以及早期症状不明显,确诊时大部分已发展为晚期,且预后差,其死亡率高<sup>[1-2]</sup>。目前卵巢癌无有效治疗手段,前期治疗主要依赖于减瘤手术至无残留病灶和铂类化疗,对于减瘤效果不佳的IV期患者,加用抗血管生成药物<sup>[3]</sup>。面对卵巢癌治疗面临的挑战,目前的研究与深入的分子和细胞分析相结合,以期寻找早期诊断、靶向治疗上皮性卵巢癌的新方法<sup>[4]</sup>。

鞘氨醇激酶1 (sphingosine kinase 1, SPHK1) 是产生鞘氨醇-1-磷酸 (sphingosine-1-phosphate, S1P) 的关键酶,其催化鞘氨醇形成S1P,是神经酰胺、鞘氨醇和S1P之间平衡的关键调节因子。SPHK1的功能广泛,其涉及多种生物过程和疾病

状态,包括炎症和免疫调节、信号通路的调节、细胞的生长和增殖以及肿瘤进展等<sup>[5-7]</sup>。SPHK1通过激活癌细胞、免疫细胞、内皮细胞和其他类型细胞表面的鞘氨醇-1-磷酸受体1 (sphingosine-1-phosphate receptor 1, S1PR1) 来调节生理功能,参与脂质代谢<sup>[8]</sup>和细胞凋亡<sup>[9]</sup>。SPHK1在许多癌症如胃癌 (gastric cancer, GC)、乳腺癌、胰腺癌和肺癌中高表达<sup>[10]</sup>,参与肿瘤微环境及肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭、血管生成和转移<sup>[6]</sup>,其表达与肿瘤的恶性程度以及不良预后相关。已有研究<sup>[11]</sup>表明:SPHK1在高级别浆液性卵巢癌的肿瘤基质中高度表达,SPHK1的过表达可以促进卵巢癌细胞的生长、血管生成和侵袭,从而促进卵巢癌的进展<sup>[12-14]</sup>。然而,SPHK1在卵巢癌中的具体作用机

制尚未完全明确。目前化疗被认为是一种用于治疗癌症的可靠方法, 其成为最常见的癌症治疗方案的一部分, 癌细胞在化疗最初很敏感, 而在治疗期间, 癌细胞通过不同的机制逐渐对几乎所有化疗药物产生耐药性, 从而导致反应性变差, 治疗效果逐渐减弱<sup>[15]</sup>。已有研究<sup>[16]</sup>表明: SPHK1与肿瘤细胞耐药机制的产生有关, 然而SPHK1在卵巢癌耐药的具体作用机制尚不清楚。本研究旨在通过构建SPHK1过表达慢病毒载体及稳转上皮性卵巢癌细胞SKOV3细胞系, 为进一步研究SPHK1在卵巢癌的发生发展以及耐药中的作用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** 人胚肾细胞(HEK-293T)和卵巢癌细胞(SKOV3细胞)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司, 感受态大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 $\alpha$ 细胞购自天根生化科技(北京)有限公司。慢病毒载体质粒GV492和病毒包装辅助质粒(Helper 1.0载体和Helper 2.0载体)由上海吉凯基因公司提供。限制性核酸内切酶*Bam*H I和*Age* I购自美国NEB公司, 质粒小提试剂盒和切胶回收试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司, NucleoZol RNA提取试剂购自基因生物技术国际贸易(上海)有限公司, 嘌呤霉素、RIPA蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂均购自北京Solarbio公司, 逆转录试剂盒和SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II均购自宝日医生物技术(北京)有限公司, 同源重组试剂盒购自美国Vazyme公司, BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术公司, 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gemini公司, RPMI 1640培养基及DMEM培养基均购自美国Gibco公司, 0.25%胰蛋白酶消化液、无蛋白快速封闭液和TBST均购自武汉赛维尔生物科技有限公司, 抗SPHK1抗体和抗GAPDH抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司, 荧光标记的羊抗兔IgG购自美国Invitrogen公司。可调式微量移液器购自德国艾本德股份公司, CKX-41型倒置荧光显微镜购自日本奥林巴斯公司, CFX96 Touch荧光定量PCR检测仪、基础电泳仪、T100 Thermal Cycler PCR基因扩增仪购自美国Bio-Rad公司, 迷你垂直电泳槽和迷你垂直转印槽购自北京韦克斯有限公司, 双色红外荧光成像系统购自美国LI-COR公司。

**1.2 HEK-293T细胞和SKOV3细胞培养** HEK-293T细胞和SKOV3细胞均为贴壁细胞, HEK-

293T细胞的生长培养基为DMEM培养基(含1%青-链霉素和10%FBS), SKOV3细胞的生长培养基为RPMI 1640培养基(含1%青-链霉素和10%FBS), 置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。细胞生长2~3d即可进行传代1次, 取处于对数生长期且细胞密度>90%的细胞, 用0.25%胰蛋白酶消化液进行消化传代或冻存。

**1.3 PCR引物设计及合成** 根据美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)提供的SPHK1数据信息(序列号NM\_001142601.2), 由上海吉凯基因有限公司结合引物的设计原则, 设计目的基因序列, SPHK1正向引物: 5'-AGGTCGACTCTAGAGG-ATCCCGCCACCATGGATCCAGCGGGCGGCC-C-3'; SPHK1反向引物: 5'-TCCTTGTTAGTCC-ATACCGGTTAAGGGCTCTTCTGGCGGTGG-CATC-3', (含交换配对碱基、酶切位点, 并含有目的基因5'端部分序列用于PCR钓取目的基因)。PCR反应体系为50  $\mu$ L: 5 $\times$ 缓冲液10  $\mu$ L, 上下游扩增引物(10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)各1  $\mu$ L, DNA模板(200 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 0.2  $\mu$ L, dNTPs(2.5  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 4  $\mu$ L, 聚合酶(2.5 $\times$ 10<sup>6</sup> U $\cdot$ L<sup>-1</sup>) 0.5  $\mu$ L, 双蒸水补足至50  $\mu$ L。PCR反应条件: 98℃预变性5 min; 98℃、10 s, 58℃、10 s, 72℃、75 s, 共30个循环, 72℃延伸8 min。PCR产物采用琼脂糖凝胶电泳回收, 储存于4℃冰箱。

**1.4 SPHK1慢病毒载体的构建和鉴定** 对GV492质粒采用*Bam*H I和*Age* I限制性内切酶进行双酶切处理, 配置酶切反应体系(50  $\mu$ L): *Bam*H I(10 $\times$ 10<sup>6</sup> U $\cdot$ L<sup>-1</sup>)1  $\mu$ L, *Age* I(10 $\times$ 10<sup>6</sup> U $\cdot$ L<sup>-1</sup>)1  $\mu$ L, 10 $\times$ 缓冲液5  $\mu$ L, 质粒DNA(1  $\mu$ g $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup>) 2  $\mu$ L, 双蒸水补足至50  $\mu$ L。使用移液枪轻柔吹打至混匀, 短暂离心后置于37℃反应过夜。对酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 回收目的载体片段。将回收的PCR产物和酶切载体片段使用同源重组试剂盒进行重组, 37℃、30 min, 冰浴5 min后转化。SPHK1重组质粒加入到感受态细胞*E. coli* DH5 $\alpha$ 中进行转化, 轻柔混匀, 置于冰上30 min, 随后42℃水浴锅进行热激90 s, 冰水冷却3 min后, 加入LB培养基(不含抗生素), 置于37℃摇床振荡使其复苏1 h。取适量菌液均匀涂布在含有100 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>氨苄青霉素的平板上, 待平板上液体被吸收后, 在37℃恒温培养箱中倒置培养, 过夜。次日挑取克

隆阳性菌落进行PCR鉴定,同时挑取单独、饱满的菌落加入到含 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素的 $5\text{ mL LB}$ 培养液中进行摇床( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ )扩大培养。取适量菌液送至上海吉凯基因有限公司进行测序鉴定,采用质粒小提试剂盒进行大量质粒抽提,得到足够量的重组质粒。

**1.5 SPHK1慢病毒包装和滴度测定** 用胰酶消化处于对数生长期的HEK-293T细胞,计数并将 $5\times 10^6$ 的细胞重新接种于直径为 $10\text{ cm}$ 的含 $10\%$ FBS DMEM培养基的细胞培养皿中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$ 培养箱中过夜培养。待 $48\text{ h}$ 后细胞密度达 $70\%\sim 80\%$ 即可进行转染。转染前 $1\text{ h}$ ,更换为 $2\%$  FBS DMEM培养基。将慢病毒质粒和慢病毒包装辅助质粒转染体系缓慢地滴加至HEK-293T细胞的培养液中,轻柔混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$ 培养箱中培养 $6\text{ h}$ ,后弃去培养基,采用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)轻柔清洗 $1\sim 2$ 遍,缓慢加入 $10\%$  FBS DMEM培养基,置于培养箱中培养 $48\text{ h}$ 。之后在荧光显微镜下观察,当细胞转染效率达 $80\%\sim 90\%$ 时,开始收集上清液。设置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ 000 g}$ 离心 $10\text{ min}$ ,采用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的滤器过滤上清液,随后设置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $25\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $2\text{ h}$ ,弃掉上清,加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 的PBS缓冲液充分溶解沉淀后,分装,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。将生长状态良好处于对数生长期的HEK-293T细胞消化接种于 $96$ 孔细胞培养板,按每孔 $4\times 10^4$ 个细胞的密度, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$ 培养箱培养 $24\text{ h}$ 后,弃去培养液,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 不同浓度( $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 和 $10^{-4}$ )的病毒液, $72\text{ h}$ 后荧光显微镜下观察细胞荧光表达情况并拍照,计算病毒滴度。病毒滴度( $\text{TU}\cdot\text{L}^{-1}$ ) = 病毒的稀释倍数 $\times$ 绿色荧光细胞数量/病毒液体积。

**1.6 SPHK1过表达慢病毒感染SKOV3细胞和稳定转染细胞系的构建** SKOV3细胞接种至 $12$ 孔细胞培养板,待细胞密度达 $30\%$ 左右,根据最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 $10$ ,按照计算公式[病毒体积 = (MOI $\times$ 细胞数目)/病毒滴度],将相应慢病毒量转染至SKOV3细胞中,分为空白组(不进行处理)、GV492对照组(GV492对照慢病毒感染SKOV3细胞)和GV492-SPHK1过表达组(ov-SPHK1组)(GV492-SPHK1过表达慢病毒感染SKOV3细胞), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$ 培养 $16\text{ h}$ 后更换RPMI 1640完全培养基,感染 $72\text{ h}$ 后观察感染效率。细胞扩大培养待细胞密度达 $60\%$ 左右,

GV492对照组和ov-SPHK1组加入含嘌呤霉素(使用最佳浓度 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的RPMI 1640完全培养基筛选稳定转染细胞, $48\text{ h}$ 后更换含嘌呤霉素的新鲜RPMI 1640完全培养基,维持嘌呤浓度在 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,培养 $14\text{ d}$ ,荧光显微镜下观察细胞的状态和荧光表达情况。

**1.7 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法检测各组SKOV3细胞中SPHK1 mRNA表达水平** 将空白组、GV492对照组和ov-SPHK1组细胞分别接种于 $6$ 孔细胞培养板,待细胞长满后收集细胞,采用NucleoZol RNA提取试剂根据说明书提取RNA,测定RNA的浓度和纯度后,按 $1\text{ }\mu\text{g}$ 计算取RNA体积进行反转录合成cDNA,行RT-qPCR检测。捷尼斯生物科技有限公司设计并合成引物,SPHK1上游引物: $5\text{'-GGCTTCATTGCTGATGTGGA-3'}$ ; SPHK1下游引物: $5\text{'-AGGAAGGTGCCAGAG-TGAA-3'}$ 。 $\beta$ -actin上游引物: $5\text{'-AGCGAGCATC-CCCCAAAGTT-3'}$ , $\beta$ -actin下游引物: $5\text{'-GGGCA-CGAAGGCTCATCATT-3'}$ 。反应体系为( $10\text{ }\mu\text{L}$ ):染料预混液 $5\text{ }\mu\text{L}$ ,双蒸水 $3\text{ }\mu\text{L}$ ,上下游扩增引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ ,cDNA $1\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 $2\text{ min}$ ;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $15\text{ s}$ ;  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $15\text{ s}$ ;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 $60\text{ s}$ ,共 $40$ 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组细胞中SPHK1 mRNA表达水平。

**1.8 Western blotting法检测各组SKOV3细胞中SPHK1蛋白表达水平** 将空白组、GV492对照组和ov-SPHK1组细胞分别接种于 $10\text{ cm}$ 培养皿,待细胞长满后收集各组细胞,采用RIPA蛋白裂解液裂解细胞,加入蛋白酶抑制剂,冰上裂解 $30\text{ min}$ ,提取蛋白后BCA法测定蛋白浓度,进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳,电泳条件为恒压 $80\text{ V}$ , $30\text{ min}$ ;恒压 $120\text{ V}$ , $90\text{ min}$ 。湿法转印至PVDF膜,采用无蛋白快速封闭液封闭 $1\text{ h}$ ,TBST洗涤 $3$ 次,每次 $10\text{ min}$ ,加入对应一抗,SPHK1( $1:1\text{ 000}$ ),GAPDH( $1:2\text{ 000}$ ),置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜孵育 $16\text{ h}$ ,TBST洗涤 $3$ 次,每次 $10\text{ min}$ ,加入荧光偶联的二抗,羊抗兔IgG( $1:10\text{ 000}$ ),避光孵育 $30\text{ min}$ ;TBST洗涤 $3$ 次,每次 $10\text{ min}$ ,采用荧光成像系统显影,各蛋白条带灰度值采用Image J软件进行分析,计算目的蛋白表达水平。SPHK1蛋白表达水平 = SPHK1蛋白条带灰度值/

GAPDH蛋白条带灰度值, 并进行归一化处理。

**1.9 统计学分析** 采用SPSS 26.0软件进行统计学分析。各组SKOV3细胞中SPHK1 mRNA和蛋白表达水平符合正态分布, 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数间比较采用One-way ANOVA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 SPHK1过表达慢病毒载体构建和鉴定** 采用BamH I和Age I限制性内切酶对GV492质粒进行双酶切, 其酶切位点见图1, 将目的基因和载体片段进行重组, 重组后载体图谱见图2。重组过表达

慢病毒质粒进行PCR鉴定和测序鉴定, 二者结果均与目的基因匹配, 测序结果与目标序列完全一致。见图3。表明SPHK1过表达慢病毒载体构建成功。

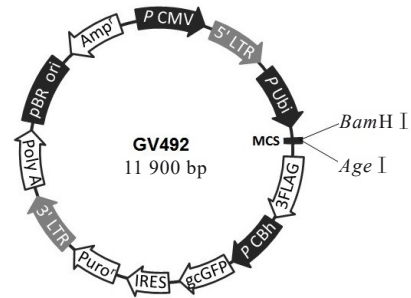


图1 GV492质粒酶切位点图

Fig.1 Map of GV492 plasmid cleavage sites

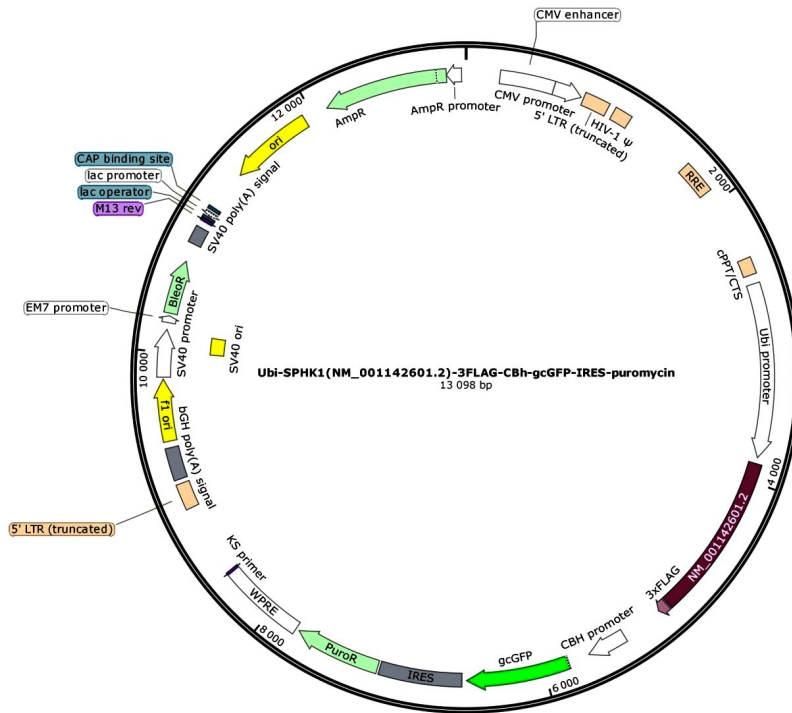


图2 SPHK1过表达慢病毒载体图谱

Fig. 2 Mapping of SPHK1 overexpression lentiviral vectors

**2.2 SPHK1慢病毒滴度** GV492对照组和ov-SPHK1组慢病毒分别转染HEK-293T细胞, 荧光显微镜下观察, 可见细胞状态良好, 贴壁生长, 绿色荧光表达强烈, 成功包装慢病毒, 见图4。经计算, GV492对照组和ov-SPHK1组病毒滴度分别为 $5 \times 10^{11}$ 和 $8 \times 10^{11}$  TU·L<sup>-1</sup>。

**2.3 SPHK1过表达慢病毒感染SKOV3细胞的构建** 根据最佳MOI=10加入各组相应病毒量分别转染SKOV3细胞, 嘌呤霉素筛选后荧光显微镜下观

察, 可见GV492对照组和ov-SPHK1组SKOV3转染细胞状态良好, 贴壁, 形态饱满, 荧光表达强烈, SKOV3稳转细胞系构建成功。见图5。

**2.4 各组SKOV3细胞中SPHK1 mRNA表达水平** 空白组、GV492对照组和ov-SPHK1组SKOV3细胞中SPHK1 mRNA表达水平分别为 $1.0000 \pm 0.1582$ 、 $1.4540 \pm 0.5445$ 和 $8.6100 \pm 2.1650$ 。与空白组和GV492对照组比较, ov-SPHK1组SKOV3细胞中SPHK1 mRNA表达水平明显升高( $P < 0.01$ )。

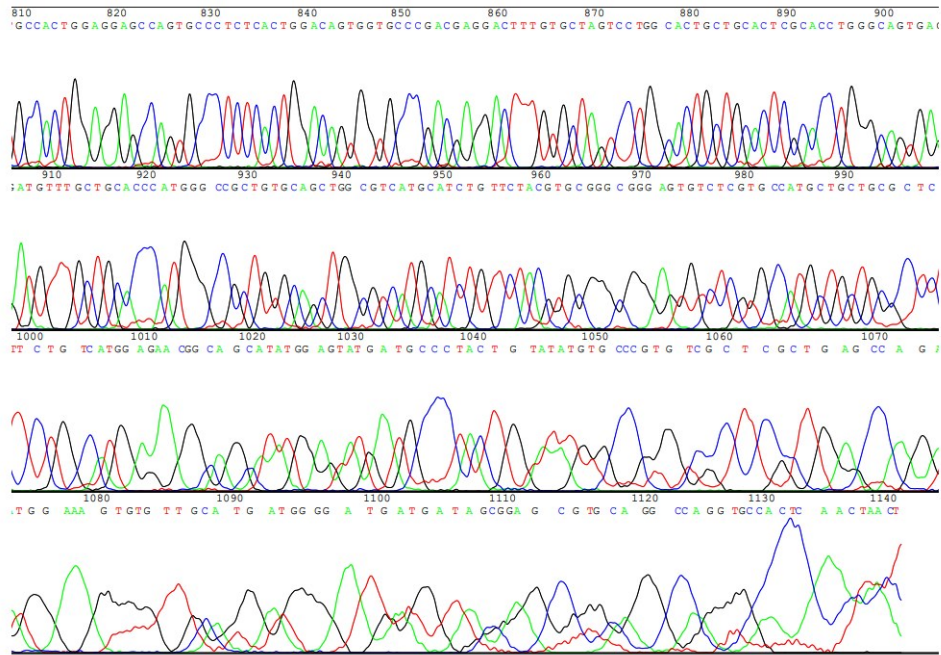


图3 SPHK1过表达慢病毒质粒测序图

Fig. 3 Sequencing maps of SPHK1 overexpression lentiviral plasmid

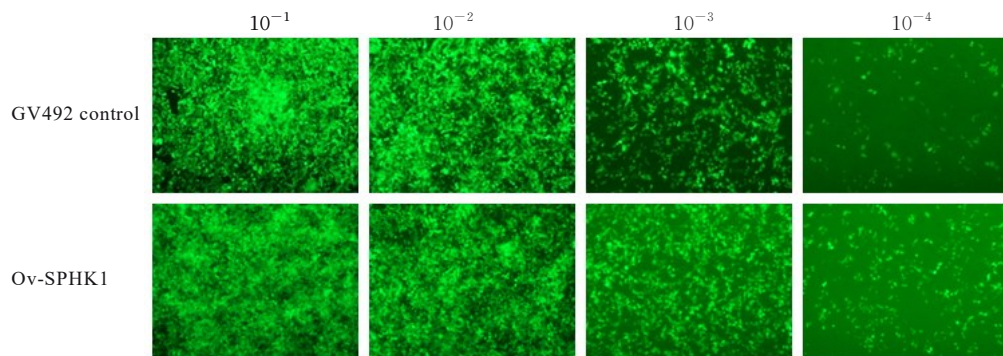


图4 荧光显微镜下慢病毒感染后2组 HEK-293T 细胞形态和荧光表达情况(×100)

Fig. 4 Morphology and fluorescence expression of HEK-293T cells in various groups after lentivirus infection under fluorescence microscope (×100)

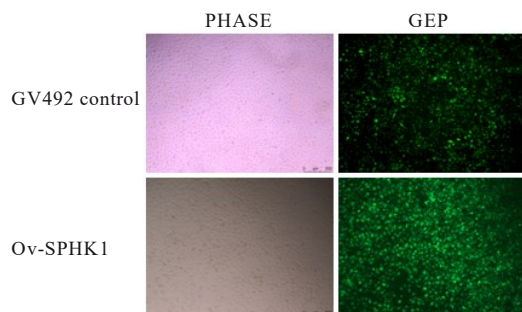


图5 荧光显微镜下慢病毒感染后2组 SKOV3 细胞形态和荧光表达情况(×50)

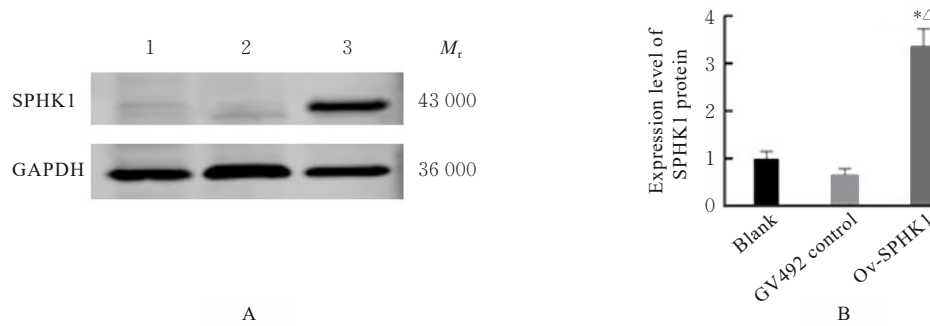
Fig. 5 Morphology and fluorescence expression of SKOV3 cells in various groups after lentivirus infection under fluorescence microscope (×50)

### 2.5 各组 SKOV3 细胞中 SPHK1 蛋白表达水平

空白组、GV492对照组和ov-SPHK1组SKOV3细胞中SPHK1蛋白表达水平分别为 $1.0000 \pm 0.1520$ 、 $0.6506 \pm 0.1399$ 和 $3.3640 \pm 0.3684$ 。与空白组和GV492对照组比较,ov-SPHK1组SKOV3细胞中SPHK1蛋白表达水平明显升高( $P < 0.01$ )。见图6。

### 3 讨论

SPHK1是鞘脂代谢中的一种限速酶,其在大多数癌症中普遍表达,在肿瘤微环境中起关键作用,参与癌症的进展,促进肿瘤的存活、增殖和凋亡。近年来,SPHK1在癌症中的作用已经有了较多研究。在GC中,SPHK1通过核因子κB(nuclear



Lane 1: Blank group; Lane 2: GV492 control group; Lane 3: Ov-SPHK1 group. \* $P < 0.01$  compared with blank group;  $\Delta P < 0.01$  compared with GV492 control group.

图6 各组 SKOV3 细胞中 SPHK1 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram (A) and histogram (B) of SPHK1 protein expression in SKOV3 cells in various groups

factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路调节 GC 细胞的侵袭和迁移, 为 GC 进展的潜在诊断标志物提供了依据<sup>[17]</sup>。SPHK1 可促进非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的发生, 抑制 SPHK1-信号转导与转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 轴可能是治疗 NSCLC 的潜在策略<sup>[18]</sup>。SPHK1 是乳腺癌进展的关键调节因子, SPHK1 的抑制可以在体内和体外抑制 Notch 信号通路, 减少三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 细胞的迁移和侵袭<sup>[19]</sup>。弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 是一种高度侵袭性的淋巴系统肿瘤, SPHK1 敲低通过抑制 DLBCL 细胞中磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinosito 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) /程序性细胞死亡配体 1 (programmed cell death-ligand 1, PD-L1) 通路来抵消化疗耐药和 T 淋巴细胞杀伤的免疫逃逸<sup>[20]</sup>。在头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 中, SPHK1 通过抑制免疫功能型 HNSCC 小鼠模型和肿瘤 T 细胞共培养物中的抗肿瘤免疫来显著促进肿瘤生长。机制分析显示, SPHK1 通过丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1) 通路调节基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 表达, 随后影响肿瘤 PD-L1 表达<sup>[21]</sup>。SPHK1 与膀胱癌细胞中的顺铂耐药呈正相关关系<sup>[22]</sup>, 并通过程序性细胞死亡配体 2 (programmed cell death ligand 2, PD-L2) /c-Src/局部黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 信号级联促进膀胱癌的转移<sup>[23]</sup>。

卵巢癌是全球女性癌症相关死亡的主要原因之

一, 5 年生存率低于 50%, 如若患者已处于晚期, 则 5 年生存率仅为 30%<sup>[24-25]</sup>。对铂类化疗的耐药性是卵巢癌患者预后不良和癌症相关死亡率的主要原因, 因此需要新的治疗策略来恢复铂类敏感性以改善患者预后。过去人们一直在寻找诊断、预后或预测生物标志物来改善卵巢癌管理。研究<sup>[26]</sup>证实: 抑制 SPHK1 后使 SKOV3 细胞对卡铂 (carboplatin, CBP) 化疗敏感, 提示 SPHK1 在靶向治疗卵巢癌中有重要作用, 表明 SPHK1 可能是卵巢癌治疗的一个潜在靶点, 通过干预 SPHK1 及其相关信号通路, 有望为卵巢癌的耐药治疗提供新思路。

本研究成功构建 SPHK1 过表达慢病毒载体和稳定转染的 SKOV3 细胞系, 为 SPHK1 在卵巢癌中作用机制的研究奠定了基础, 为探讨卵巢癌铂类化疗耐药的分子机制及精准靶向治疗的研究提供参考。

#### 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:

苏秋源参与实验操作、数据获取和分析及论文撰写, 赵玲、谭佳佳、莫世恩和周海琴参与实验设计和论文审校, 卢芳芳、韦依和周洋参与文献检索, 况燕参与论文审阅和修改。

#### [参考文献]

- [1] LHEUREUX S, GOURLEY C, VERGOTE I, et al. Epithelial ovarian cancer[J]. Lancet, 2019, 393(10177): 1240-1253.
- [2] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. CA A Cancer J Clin, 2024, 74(1): 12-49.

- [3] GAITSKELL K, ROGOZIŃSKA E, PLATT S, et al. Angiogenesis inhibitors for the treatment of epithelial ovarian cancer[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2023, 4(4): CD007930.
- [4] LHEUREUX S, BRAUNSTEIN M, OZA A M. Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(4): 280-304.
- [5] BU Y H, WU H, DENG R, et al. Therapeutic potential of SphK1 inhibitors based on abnormal expression of SphK1 in inflammatory immune related-diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 733387.
- [6] KHOEI S G, SADEGHI H, SAMADI P, et al. Relationship between Sphk1/S1P and microRNAs in human cancers[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2021, 68(2): 279-287.
- [7] HII L W, CHUNG F F, MAI C W, et al. Sphingosine kinase 1 regulates the survival of breast cancer stem cells and non-stem breast cancer cells by suppression of STAT1[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 886.
- [8] NAGAHASHI M, MIYOSHI Y. Targeting sphingosine-1-phosphate signaling in breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(6): 3354.
- [9] BAO J M, ZHI X, YUAN H Y, et al. Overexpression of SPHK1 associated with targeted therapy resistance in predicting poor prognosis in renal cell carcinoma [J]. *Transl Cancer Res*, 2023, 12(3): 572-584.
- [10] RIBONI L, ABDEL HADI L, NAVONE S E, et al. Sphingosine-1-phosphate in the tumor microenvironment: a signaling hub regulating cancer hallmarks[J]. *Cells*, 2020, 9(2): 337.
- [11] BEACH J A, ASPURIA P P, CHEON D J, et al. Sphingosine kinase 1 is required for TGF- $\beta$  mediated fibroblast-to-myofibroblast differentiation in ovarian cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(4): 4167-4182.
- [12] HART P C, CHIYODA T, LIU X J, et al. SPHK1 is a novel target of metformin in ovarian cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(4): 870-881.
- [13] ZHANG H W, WANG Q Y, ZHAO Q, et al. miR-124 inhibits the migration and invasion of ovarian cancer cells by targeting SphK1[J]. *J Ovarian Res*, 2013, 6(1): 84.
- [14] DAI L, LIU Y X, XIE L, et al. Sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis is involved in ovarian cancer angiogenesis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 74947-74961.
- [15] RAMOS A, SADEGHI S, TABATABAEIAN H. Battling chemoresistance in cancer: root causes and strategies to uproot them[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9451.
- [16] ALKAFSAAS S S, ELSALAHATY M I, ISMAIL D F, et al. The emerging roles of sphingosine 1-phosphate and SphK1 in cancer resistance: a promising therapeutic target[J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 89.
- [17] LING Q, JI K, CHEN J, et al. Sphingosine kinase-1 regulates migration and invasion of gastric cancer cells *via* targeting the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2024, 44(11): 2163-2171.
- [18] MA Y F, XING X, KONG R R, et al. SphK1 promotes development of non-small cell lung cancer through activation of STAT3[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 47(1): 374-386.
- [19] WANG S S, LIANG Y Y, CHANG W X, et al. Triple negative breast cancer depends on sphingosine kinase 1 (SphK1)/sphingosine-1-phosphate (S1P)/sphingosine 1-phosphate receptor 3 (S1PR3)/Notch signaling for metastasis[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 1912-1923.
- [20] LIU D, LIU L L, LI H M, et al. Sphingosine kinase 1 counteracts chemosensitivity and immune evasion in diffuse large B cell lymphoma cells *via* the PI3K/AKT/PD-L1 axis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 143(Pt 2): 113361.
- [21] FANG Q, CHEN X, CAO F, et al. SPHK1 promotes HNSCC immune evasion by regulating the MMP1-PD-L1 axis[J]. *Theranostics*, 2024, 14(18): 7199-7218.
- [22] QIN Z J, TONG H, LI T H, et al. SPHK1 contributes to cisplatin resistance in bladder cancer cells *via* the NONO/STAT3 axis[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(5). DOI:10.3892/ijmm.2021.5037.
- [23] KAO W H, LIAO L Z, CHEN Y, et al. SPHK1 promotes bladder cancer metastasis *via* PD-L2/c-Src/FAK signaling cascade[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(9): 678.
- [24] QIU J G, XU Q, PANAH T, et al. Reactive oxygen species mediate ovarian cancer development, platinum resistance, and angiogenesis *via* CXCL8 and GSK-3 $\beta$ /p70S6K1 axis[J]. *Genes Dis*, 2025, 12(2): 101378.
- [25] ZHU J W, CHARKHCHI P, AKBARI M R. Potential clinical utility of liquid biopsies in ovarian cancer[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 114.
- [26] WANG C, LI Q, SONG K Q, et al. Nanoparticle co-delivery of carboplatin and PF<sub>5</sub>43 restores platinum sensitivity in ovarian cancer models through inhibiting platinum-induced pro-survival pathway activation [J]. *Nanoscale Adv*, 2024, 6(16): 4082-4093.