

MiR-181c-5p 对卵巢癌干细胞样细胞肿瘤血管生成拟态的作用及其机制

吴颖颖¹ 文小玲² 夏玉芳¹ 于啸¹ 娄艳辉¹

(1 青岛大学附属医院妇科, 山东 青岛 266003; 2 佛山市第一人民医院妇产科)

[摘要] 目的 探讨 *miR-181c-5p* 对卵巢癌干细胞样细胞(OCS-LCs)肿瘤血管生成拟态(VM)的作用及其机制。方法 采用无血清悬浮培养法将人卵巢癌细胞系 OVCAR3 细胞诱导形成 OCS-LCs。将 OVCAR3 细胞分为 A~C 组, 各组分别转染 NC-*miR-181c-5p*、siRNA-*miR-181c-5p* 和 pRNA-*miR-181c-5p*。通过成球实验评估 A~C 组细胞成球能力。采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法检测 A~C 组细胞 *miR-181c-5p* 的相对表达量, 采用 Western blot 实验检测 A~C 组细胞 Oct-4、Nanog、HIF-1 α 和 VEGF 蛋白相对表达量。采用 CCK-8 实验检测 A~C 组细胞的活性, 采用三维立体培养实验检测 A~C 组的血管形成率。结果 OVCAR3 细胞成功被诱导形成 OCS-LCs。RT-qPCR 实验结果显示, B 组细胞的 *miR-181c-5p* 相对表达量显著低于 A 组, C 组高于 A 组($t=2.25, 8.68, P<0.05$)。成球实验结果显示, B 组与 A 组、A 组与 C 组相比, 细胞的成球周期显著缩短, 最大的细胞球直径显著增大, 成球率显著增加($t=5.56\sim 33.66, P<0.05$)。Western blot 实验结果表明, B 组与 A 组、A 组与 C 组相比, Oct-4、Nanog、HIF-1 α 和 VEGF 蛋白相对表达量显著升高($t=4.51\sim 56.15, P<0.05$)。CCK-8 实验结果显示, B 组的细胞活性高于 A 组, C 组低于 A 组($F=97.70\sim 281.80, P<0.05$)。三维立体培养实验结果显示, B 组与 A 组、A 组与 C 组相比较, 血管形成率显著性提高($t=3.70, 18.67, P<0.05$)。结论 *miR-181c-5p* 可能通过降低细胞中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达, 从而抑制 OCS-LCs 的 VM 形成。

[关键词] 卵巢肿瘤; 肿瘤干细胞; 微 RNAs; 缺氧诱导因子 1, α 亚基; 血管内皮生长因子类; 新生血管化, 病理性; 体外培养技术

[中图分类号] R737.31; R364.3

[文献标志码] A

Effect of *miR-181c-5p* on vasculogenic mimicry in ovarian cancer stem-like cells and its mechanism

WU Yingying, WEN Xiaoling, XIA Yufang, YU Xiao, LOU Yanhui (Department of Gynecology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of *miR-181c-5p* on vasculogenic mimicry (VM) in ovarian cancer stem-like cells (OCS-LCs) and its mechanism. **Methods** OVCAR3 cells were induced into OCS-LCs by serum-free suspension culture. OVCAR3 cells were divided into groups A, B, and C and were transfected with NC-*miR-181c-5p*, siRNA-*miR-181c-5p*, and pRNA-*miR-181c-5p*, respectively. The sphere-forming experiment was used to assess the sphere formation ability of groups A, B, and C. RT-qPCR was used to measure the relative expression level of *miR-181c-5p* in cells of groups A, B, and C, and Western blot was used to measure the relative protein expression levels of Oct-4, Nanog, HIF-1 α , and VEGF in cells of groups A, B, and C. CCK-8 assay was used to measure the viability of cells in groups A, B, and C, and the three-dimensional culture experiment was used to measure the angiogenesis rate of groups A, B, and C. **Results** OVCAR3 cells were successfully induced into OCS-LCs. RT-qPCR showed that group B had a significantly lower relative expression level of *miR-181c-5p* than group A, and group C had a significantly higher relative expression level than group A ($t=2.25, 8.68, P<0.05$). The sphere-forming experiment showed that compared with group A, group B had significant decreases in sphere-forming cycle, and increases in maximum sphere diameter, and sphere-forming rate, and compared group A with group C, these indicators had the same changes ($t=5.56\sim 33.66, P<0.05$). Western blot showed that compared with group A, group B had significant increases in the relative protein expression levels of Oct-4, Nanog, HIF-1 α , and VEGF, and compared with group C, group A had significant increases in the relative expression levels of these proteins ($t=4.51\sim 56.15, P<0.05$). CCK-8 assay showed that group B had a significantly higher cell viability than group A, and group C had a significantly lower cell viability than group A ($F=97.70\sim 281.80, P<0.05$). The three-dimensional culture experiment showed that group B had a significant increase in angiogenesis rate compared with group A, and compared with group C, group A had a significant increase in angiogenesis rate ($t=3.70, 18.67, P<0.05$). **Conclusion** This study shows that *miR-181c-5p* may inhibit VM formation in OCS-LCs by reducing the protein expression levels of HIF-1 α and VEGF in cells.

[KEY WORDS] Ovarian neoplasms; Neoplastic stem cells; MicroRNAs; Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; Vascular endothelial growth factors; Neovascularization, pathologic; *In vitro* techniques

[收稿日期] 2023-10-27; [修订日期] 2024-01-23

[基金项目] 青岛市市南区科技计划项目(2022-2-006-YY)

[通讯作者] 娄艳辉, Email: louyh@qdu.edu.cn

肿瘤血管生成拟态(VM)是一种依赖于肿瘤细胞而非内皮细胞的肿瘤血管生成形式, 能促进卵巢

癌干细胞生长和转移^[1-2], 缺氧诱导因子(HIF-1 α)和血管内皮生长因子(VEGF)是 VM 形成的重要标志物^[3]。研究发现 miRNA 在调控 VM 方面发挥着非常重要的作用, 参与介导了肿瘤细胞中 HIF-1 α 以及 VEGF 等多种血管生成因子的表达^[4]。MiR-181 属于 miRNA 中的一员, 包括 miR-181a-5p 以及 miR-181c-5p。课题组前期研究发现, miR-181a-5p 在卵巢癌组织中的表达显著低于正常卵巢组织和输卵管组织, 且具有抑制卵巢癌细胞迁移及侵袭的作用^[5]。研究发现, miR-181 家族中的另一重要成员 miR-181c-5p, 在卵巢癌组织中表达水平也低于正常卵巢组织^[6], 但 miR-181c-5p 是否具有抑制卵巢癌干细胞样细胞(OCS-LCs)增殖的作用尚不清楚, 其是否可以通过介导 OCS-LCs 中 HIF-1 α 、VEGF 的表达调节 VM 形成也未见相关报道。因此, 本研究拟探究 miR-181c-5p 对 OCS-LCs VM 的作用及其机制, 为卵巢癌的治疗寻找新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料来源

人卵巢癌细胞系 OVCAR3 细胞(美国模式培养物集存库), 胰岛素(美国 Sigma 公司), 表皮细胞生长因子(EGF)、重组人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, 美国 Peprotech 公司), 小干扰 RNA(上海吉玛制药技术有限公司), 鼠抗人 CD133(抗 CD133-APC)流式抗体及同型鼠 IgG 抗体(美国 Biolegend 公司), 兔源 HIF-1 α 单克隆一抗(美国 CST 公司), Prime Script RT Reagent Kit 试剂盒以及 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒(日本 TaKaRa 公司), 兔源 GAPDH 单克隆一抗(武汉赛维尔生物科技有限公司), 兔源 VEGF 单克隆一抗、兔源 Oct-4 多克隆一抗、兔源 Nanog 多克隆一抗(武汉爱博泰克生物科技有限公司), 辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 OVCAR3 细胞接种于含血清培养基(含体积分数 0.01 青霉素-链霉素双抗溶液和体积分数 0.10 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基)中, 置于 37 °C、含体积分数 0.05 的 CO₂ 培养箱中培养至合适密度后用于后续实验。

1.2.2 无血清悬浮培养法诱导 OCS-LCs 形成 将处于对数生长期的 OVCAR3 细胞, 以 1×10^6 个/L 密度接种于超低吸附 6 孔板中, 用无血清培养基(含有 DMEM/F12 培养基、体积分数 0.04 BSA、5 g/L

胰岛素、0.02 g/L EGF、0.01 g/L bFGF)培养 7~10 d, 隔天换液一次, 直至细胞生长成球形。当细胞球直径 $> 70 \mu\text{m}$ 时, 即为 OCS-LCs。观察并记录 OCS-LCs 的成球周期、最大的细胞球直径和成球率。成球周期为自 OVCAR3 细胞开始培养至培养基中出现直径为 $70 \mu\text{m}$ 的细胞球时的最短培养时间, 成球率 = 直径 $> 70 \mu\text{m}$ 的细胞球数量/接种的 OVCAR3 细胞数量 $\times 100\%$ 。

1.2.3 OCS-LCs 鉴定 ①二次成球实验: 取直径 $> 70 \mu\text{m}$ 的细胞球, 吹散成单细胞悬液以后, 重新接种于超低吸附 6 孔板中, 使用无血清培养基再培养 7~14 d, 观察是否可二次成球。②贴壁再分化实验: 将吹散成单细胞的悬液培养于含血清培养基中, 24 h 后观察细胞贴壁情况。③流式分析技术检测细胞 CD133 阳性率: 取处于对数生长期 OVCAR3 细胞和直径 $> 70 \mu\text{m}$ 的细胞球, 分别置于 1.5 mL 的 EP 管中, 再向其内分别加入 $1 \mu\text{g}$ 抗 CD133-APC 抗体, 以 IgG 为同型对照, 避光孵育 30 min 后, 用流式细胞仪检测 OVCAR3 细胞和 OCS-LCs 的 CD133 阳性细胞数, 并计算各自相应的 CD133 阳性率。

1.2.4 细胞的分组和处理 将处于对数生长期的 OVCAR3 细胞分为 A~C 组, 分别转染 NC-miR-181c-5p、siRNA-miR-181c-5p 和 pRNA-miR-181c-5p, 于含血清培养基中培养 24 h 后, 更换为无血清培养基继续培养 21 d, 隔天换液一次。

1.2.5 细胞成球实验 在无血清培养基中培养的 21 d 内, 记录 A~C 组细胞的成球周期, 测量各组最大的细胞球直径, 并计算成球率, 以此评估各组细胞的成球能力。

1.2.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 OCS-LCs 中 miR-181c-5p 相对表达量 取培养 21 d 的各组细胞, 用 Trizol 试剂提取细胞中总 RNA, 采用 Prime Script RT Reagent Kit 试剂盒以及 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒, 分别按照说明书进行反转录和扩增。引物序列分别为, U6-F: 5'-GCT-TCGCGCAGCACATATACTAAAAT-3', U6-R: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3', miR-181c-5p-F: 5'-CGAACATTCAACGCTGTTCG-3', miR-181c-5p-R: 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'。以 U6 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各组细胞当中 miR-181c-5p 相对表达量。

1.2.7 蛋白质印迹实验(Western blot)检测 OCS-LCs 中 Oct-4、Nanog、HIF-1 α 和 VEGF 蛋白相对表达量 取培养 21 d 的各组细胞, 用 RIPA 裂解液充

分裂解细胞。加入 5×loading buffer 煮沸后变性处理,BCA 法检测蛋白浓度。使用 PAGE 凝胶快速制备试剂盒制备 SDS-PAGE 凝胶,在凝胶小孔中加入 10~20 μL 各组细胞提取的蛋白样品。调节电泳仪,先用 80 V 电泳 30 min 以后更改为 110 V 恒压 60 min 分离细胞裂解物,280 mA 转膜 90 min,将蛋白转移到 PVDF 膜上,一抗 4 °C 下孵育过夜。加入辣根酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗,室温下缓慢摇动孵育 2 h。最后使用化学发光增强剂进行免疫印迹显色,在显影仪下拍照,并使用 Image J 软件对条带进行量化分析,计算 Oct-4、Nanog、HIF-1α 以及 VEGF 蛋白的相对表达量。

1.2.8 CCK-8 实验检测 OCS-LCs 的细胞活性 取 A~C 组处于对数生长期的细胞,稀释成细胞密度为 1×10^7 个/L 的细胞悬液,按 1 000 个/孔分别接种于 96 孔板。各组分别在培养第 24、48、72、96 小时,加入 CCK-8 试剂,然后避光孵育 2 h,使用酶标仪于 450 nm 波长处检测各组细胞吸光度值,并计算细胞活性。

1.2.9 三维立体培养实验检测 OCS-LCs 的血管形成率 将 Matrigel 基质胶与 DMEM 混合液(1:1) 200 μL 混合后均匀铺于提前预冷的 24 孔板上,于培养箱中放置 45 min,以促进凝固。取 A~C 组处于对数生长期细胞,稀释成细胞密度 1×10^8 个/L 的细胞悬液,按照每孔 1×10^4 个细胞的数量分别接种于 24 孔板当中。每隔 2 h 用倒置相差显微镜观察 VM 的形成情况,并拍照,同时记录血管形成数,计算血管形成率。血管形成率=血管形成数/接种细胞数×100%。

1.3 统计学处理

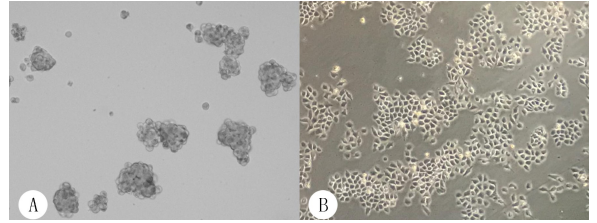
采用 SPSS 26 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验;多组不同时间点的比较采用重复测量设计方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 OCS-LCs 形成和鉴定结果

在将 OVCAR3 细胞诱导形成 OCS-LCs 过程中,4~7 d 时 OVCAR3 细胞聚集形成细胞球,形态呈圆形串珠样,8~10 d 后细胞球持续增大,形状逐渐呈规则球形,密度更加紧密。二次成球实验显示,单细胞悬液在无血清培养基中继续培养时,能再次聚集形成细胞球,并克隆生长(图 1A)。在贴壁再分

化实验中,培养于含血清培养基中的单细胞悬液,培养 24 h 后可重新分化,并可贴壁生长(图 1B)。流式分析技术检测结果显示,OCS-LCs 和 OVCAR3 细胞的 CD133 阳性率分别为 $(18.00 \pm 1.60)\%$ 、 $(7.10 \pm 1.10)\%$,两者比较差异有显著性($t = 14.20, P < 0.05$)。



A:二次成球实验结果(100倍);B:贴壁再分化实验结果(40倍)

图 1 OCS-LCs 鉴定结果

2.2 MiR-181c-5p RNA 对 OCS-LCs 成球能力的影响

A~C 组细胞在无血清培养基中均能够继续成球生长,成球周期分别为 (13.00 ± 0.58) 、 (8.30 ± 0.33) 、 (17.00 ± 0.58) d;最大的细胞球直径平均值分别为 (121.00 ± 4.04) 、 (172.00 ± 4.41) 、 (78.30 ± 3.84) μm;成球率分别为 $(3.13 \pm 0.18)\%$ 、 $(9.03 \pm 0.19)\%$ 、 $(1.38 \pm 0.11)\%$ 。各组间上述三项指标比较差异均有显著性($F = 72.57 \sim 621.90, P < 0.05$),同时各组间两两比较,上述三项指标也均差异有显著性($t = 5.56 \sim 33.66, P < 0.05$)。

2.3 MiR-181c-5p 对 OCS-LCs 中 Oct-4、Nanog、HIF-1α 和 VEGF 表达的影响

RT-qPCR 检测结果显示,A~C 组的细胞内 miR-181c-5p 相对表达量依次为 1.01 ± 0.14 、 0.24 ± 0.06 、 3.20 ± 0.71 ,各组之间整体上比较差异具有显著性($F = 40.61, P < 0.05$),各组之间两两比较也均差异具有显著性($t = 2.25 \sim 8.68, P < 0.05$)。Western blot 实验的结果显示,各组之间细胞内 Oct-4、Nanog、HIF-1α 以及 VEGF 蛋白相对表达量比较差异具有显著性($F = 89.54 \sim 1 597.00, P < 0.05$),各组之间两两比较上述 4 个蛋白相对表达量差异也均具有显著意义($t = 4.51 \sim 56.15, P < 0.05$)。见表 1、图 2。

表 1 各组细胞内 Oct-4、Nanog、HIF-1α 和 VEGF 蛋白相对表达量比较(n=3,x±s)

组别	Oct-4	Nanog	HIF-1α	VEGF
A 组	1.01±0.02	1.00±0.02	1.02±0.03	1.00±0.01
B 组	1.89±0.12	1.68±0.04	1.74±0.19	3.85±0.29
C 组	0.75±0.01	0.55±0.02	0.53±0.01	0.06±0.01

2.4 MiR-181c-5p 对 OCS-LCs 的细胞活性和血管形成率的影响

CCK-8 实验检测结果显示,时间、分组和时间与分组的交互作用对细胞活性均具有显著性影响 ($F_{\text{时间}} = 553.80, F_{\text{组别}} = 543.30, F_{\text{交互}} = 38.57, P < 0.05$);单独效应结果显示,随培养时间延长,每组细胞的细胞活性均逐渐增高,差异有显著性 ($F_{\text{组内}} = 118.80 \sim 281.80, P < 0.05$),在培养第 24、48、72 和 96 小时时,各组间两两比较,细胞活性均差异有显著性 ($F_{\text{组间}} = 97.70 \sim 211.10, P < 0.05$)。见表 2。三维立体培养实验检测结果显示,A~C 组细胞的血管形成率依次为 $(100.00 \pm 13.48)\%$ 、 $(385.30 \pm 35.66)\%$ 、 $(29.41 \pm 13.48)\%$,各组比较差异具有显著性 ($F = 195.40, P < 0.05$),同时各组间两两比较也均差异具有显著性 ($t = 3.70 \sim 18.67, P < 0.05$)。见图 3。

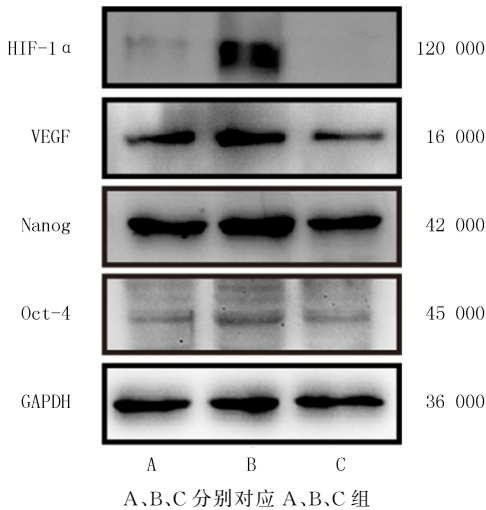
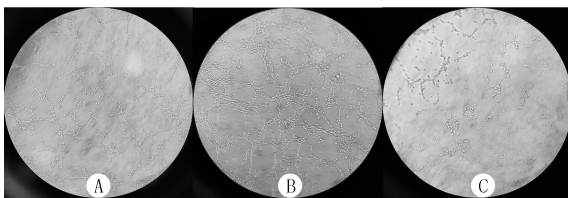


图 2 各组细胞内 Oct-4、Nanog、HIF-1α 和 VEGF 蛋白相对表达量

表 2 各组细胞不同时间点的细胞活性比较 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	第 24 小时	第 48 小时	第 72 小时	第 96 小时
A 组	0.46 ± 0.02	1.13 ± 0.08	1.96 ± 0.10	2.10 ± 0.09
B 组	0.55 ± 0.05	1.49 ± 0.11	2.53 ± 0.13	2.63 ± 0.17
C 组	0.19 ± 0.01	0.45 ± 0.04	0.85 ± 0.07	0.93 ± 0.08



A、B、C 分别对应 A、B、C 组

图 3 三组细胞的血管形成率比较

3 讨 论

肿瘤干细胞(CSCs)是一类具有自我更新和多

向分化能力的异质性细胞,能促进肿瘤细胞的转移,增加肿瘤细胞的化疗抗性,参与肿瘤的发展、转移和复发^[7-8]。研究认为 OCS-LCs 增加了卵巢癌浸润和转移的风险,同时也是导致癌症复发和化疗耐药的原因之一^[8]。因此,深入研究 OCS-LCs 的发生发展机制,寻找卵巢癌治疗的新靶点是目前卵巢癌临床治疗的研究热点之一。本研究首先对诱导形成的悬浮细胞球进行验证,结果显示,将细胞球重悬成单细胞后,在无血清培养基中可再次聚集成细胞球,在含血清培养基中则可以重新分化,并能够贴壁生长。CD133 是一种糖基化膜蛋白,是目前比较公认的 OCS-LCs 表面标志物之一,本研究的流式分析技术检测结果显示,OCS-LCs 的 CD133 阳性率明显高于 OVCAR3 细胞。以上三种验证方法均表明,本研究成功诱导形成了 OCS-LCs。

MiRNA 能调节 CSCs 的发生发展^[9]。研究发现,在乳腺癌干细胞中,上调 *miR-526b-3p* 表达能抑制乳腺癌干细胞形成;用上调 *miR-526b-3p* 的乳腺癌干细胞构建裸鼠移植瘤模型,发现裸鼠的移植瘤体积缩小、质量减轻,说明移植瘤生长被抑制^[10]。YU 等^[11]发现在骨髓间充质干细胞 BMSCs 中,上调 *miR-181c-5p* 能抑制 SFRP1/Wnt/ β -catenin 通路,促进干细胞分化成破骨细胞。本研究结果显示,B 组与 A 组、A 组与 C 组相比,细胞内 *miR-181c-5p* 相对表达量显著减少,提示小干扰 RNA 转染成功。成球实验结果显示,与 A 组细胞相比,B 组细胞的成球周期缩短、最大的细胞球直径增大、成球率提高,C 组细胞的成球周期延长、最大的细胞球直径减小、成球率降低。Oct-4、Nanog 是 CSCs 的转录因子,是识别 CSCs 的生物标志物^[12]。本研究结果显示,B 组细胞的 Oct-4、Nanog 蛋白的相对表达量高于 A 组,C 组细胞的 Oct-4、Nanog 的蛋白相对表达量低于 A 组。上述结果提示 *miR-181c-5p* 可降低 OVCAR3 细胞的成球能力,抑制 OCS-LCs 的形成。研究发现,在肺腺癌 H460 细胞中,上调 *miR-181c-5p* 能提高细胞活性,促进肿瘤细胞增殖^[13];上调宫颈鳞状细胞癌 SiHa 细胞内 *miR-181c-5p* 表达后,细胞增殖受到显著抑制^[14]。本研究结果显示,A~C 组细胞的细胞活性随培养时间延长而逐渐增高;在培养第 24、48、72 和 96 小时时,B 组细胞的细胞活性均高于 A 组,C 组细胞的细胞活性低于 A 组,提示 *miR-181c-5p* 可抑制 OCS-LCs 的增殖。

VM 是肿瘤血管生成形式之一,通过肿瘤细胞变形和细胞外基质相互作用等方式模拟内皮细胞,

环绕形成管腔^[15]。YI 等^[16]研究发现,在体外模型和裸鼠移植瘤模型中,高水平的 *miR-374b-5p* 可抑制神经胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭和 VM 的形成;上调 *miR-181c-5p* 表达可通过调节骨髓源性内皮祖细胞的血管生成,促进 VM 形成^[17],均提示 miRNA 参与了调控肿瘤 VM 的形成。本研究三维立体培养实验结果显示,与 A 组相比,B 组的血管形成率显著提高,C 组的血管形成率显著降低。HIF-1 α 和 VEGF 是影响 VM 形成的重要因子,其在肿瘤组织中的表达水平增高通常意味着 VM 形成增多^[17-18]。由于肿瘤细胞生长迅速,肿瘤内部血供不足,导致肿瘤细胞缺氧。当肿瘤细胞缺氧时,细胞中 HIF-1 α 含量会明显增高,进而促进上皮-间质转化和 VM 形成^[19],因此可以通过降低肿瘤细胞中 HIF-1 α 的水平来抑制 VM 形成,延缓肿瘤进展^[20],如 Hsp90 抑制剂 AT-533 就是通过阻断 HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2 通路,抑制了乳腺癌细胞的生长和 VM 的形成^[21]。VEGF 是一种与肿瘤进展和预后密切相关的血管生成启动子。而通过降低卵巢癌细胞中的 VEGF 水平是卵巢癌治疗的重要手段之一,具有良好的应用前景^[22]。最新研究发现,贝伐珠单抗能改善低表达 VEGF-A165b(一种抗血管生成 VEGF-A 剪接变体)的晚期卵巢癌患者的预后,而对高表达 VEGF-A165b 的晚期卵巢癌患者的预后没有影响,这对指导晚期卵巢癌患者的治疗决策具有重要临床意义^[23]。本研究结果显示,B 组与 A 组、A 组与 C 组相比,OCS-LCs 中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白相对表达量增加,提示 *miR-181c-5p* 对 OCS-LCs 的 VM 形成具有抑制作用,可能是通过下调 HIF-1 α 以及 VEGF 的表达实现的,但具体机制仍有待深入探究。

综上所述,本研究成功诱导形成了 OCS-LCs,上调 OCS-LCs 内的 *miR-181c-5p* 表达,可显著抑制其增殖和 VM 的形成,其机制可能是 *miR-181c-5p* 降低了细胞内 Oct-4、Nanog、HIF-1 α 和 VEGF 的蛋白水平。这为寻找卵巢癌的抗血管治疗的新靶点提供了理论支持。

作者声明:吴颖颖、文小玲、娄艳辉参与了研究设计;吴颖颖、刘小玲、夏玉芳、于啸、娄艳辉参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

[1] LUO Q X, WANG J, ZHAO W Y, et al. Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications[J]. J Hematol Oncol, 2020,13(1):19.

[2] LIANG J, YANG B, CAO Q Y, et al. Association of vasculogenic mimicry formation and CD133 expression with poor prognosis in ovarian cancer[J]. Gynecol Obstet Invest, 2016, 81(6):529-536.

[3] BHAT S M, BADIGER V A, VASISHTA S, et al. 3D tumor angiogenesis models: Recent advances and challenges[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2021,147(12):3477-3494.

[4] STIEG D C, WANG Y F, LIU L Z, et al. ROS and miRNA dysregulation in ovarian cancer development, angiogenesis and therapeutic resistance[J]. Int J Mol Sci, 2022,23(12):6702.

[5] 蒋玲,夏玉芳,于啸,等. Linc-ROR 靶向 miR-181a-5p 调控卵巢上皮性癌细胞恶性生物学行为的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2022,8(4):301-306.

[6] 张瑜,古丽,叶青,等. 上皮性卵巢癌组织中 linc-ROR、miR-181c-5p 的表达及临床意义[J]. 中国性科学, 2023,9(9):57-62.

[7] AHMED N, KADIFE E, RAZA A, et al. Ovarian cancer, cancer stem cells and current treatment strategies: A potential role of magmas in the current treatment methods[J]. Cells, 2020,9(3):719.

[8] MUNOZ-GALVAN S, CARNERO A. Targeting cancer stem cells to overcome therapy resistance in ovarian cancer[J]. Cells, 2020,9(6):1402.

[9] CORADDUZZA D, CRUCIANI S, ARRU C, et al. Role of miRNA-145, 148, and 185 and stem cells in prostate cancer[J]. Int J Mol Sci, 2022,23(3):1626.

[10] LIU J H, LI W T, YANG Y, et al. MiR-526b-3p attenuates breast cancer stem cell properties and chemoresistance by targeting HIF-2 α /Notch signaling[J]. Front Oncol, 2021, 11: 696269.

[11] YU X, RONG P Z, SONG M S, et al. lncRNA SNHG1 induced by SP1 regulates bone remodeling and angiogenesis via sponging miR-181c-5p and modulating SFRP1/Wnt signaling pathway[J]. Mol Med, 2021,27(1):141.

[12] KHOSRAVI A, JAFARI S M, ASADI J. Knockdown of TAZ decrease the cancer stem properties of ESCC cell line YM-1 by modulation of Nanog, OCT-4 and SOX2[J]. Gene, 2021,769: 145207.

[13] WANG J, LI M, WANG M G, et al. MiR-181c-5p regulates lung adenocarcinoma progression via targeting PRKN[J]. Biochem Genet, 2023,62(2):1103-1114.

[14] LI N N, CHENG C, WANG T Y. MiR-181c-5p mitigates tumorigenesis in cervical squamous cell carcinoma via targeting glycogen synthase kinase 3 β interaction protein (GSKIP)[J]. Onco Targets Ther, 2020,13:4495-4505.

[15] SEFTOR R E, HESS A R, SEFTOR E A, et al. Tumor cell vasculogenic mimicry: From controversy to therapeutic promise[J]. Am J Pathol, 2012,181(4):1115-1125.

[16] YI B L, LI H, CAI H, et al. LOXL1-AS1 communicating with TIAR modulates vasculogenic mimicry in glioma via regulation of the miR-374b-5p/MMP14 axis[J]. J Cell Mol Med, 2022,26(2):475-490.

body fusion; An analysis and potential risk factors[J]. *Global Spine J*, 2023,13(7):1981-1991.

- [8] ABBUSHI A, CABRAJA M, THOMALE U W, et al. The influence of cage positioning and cage type on cage migration and fusion rates in patients with monosegmental posterior lumbar interbody fusion and posterior fixation[J]. *Eur Spine J*, 2009,18(11):1621-1628.
- [9] JIN C Z, JAISWAL M S, JEUN S S, et al. Outcomes of oblique lateral interbody fusion for degenerative lumbar disease in patients under or over 65years of age[J]. *J Orthop Surg Res*, 2018,13(1):38.
- [10] MARCHI L, ABDALA N, OLIVEIRA L, et al. Radiographic and clinical evaluation of cage subsidence after stand-alone lateral interbody fusion[J]. *J Neurosurg Spine*, 2013,19(1):110-118.
- [11] HOU Y, LUO Z J. A study on the structural properties of the lumbar endplate: Histological structure, the effect of bone density, and spinal level[J]. *Spine*, 2009,34(12):E427-E433.
- [12] XI Z, MUMMANENI P V, WANG M H, et al. The association between lower Hounsfield units on computed tomography and cage subsidence after lateral lumbar interbody fusion[J]. *Neurosurg Focus*, 2020,49(2):E8.
- [13] RAN L Y, XIE T H, ZHAO L, et al. Low Hounsfield units on computed tomography are associated with cage subsidence following oblique lumbar interbody fusion (OLIF)[J]. *Spine J*, 2022,22(6):957-964.
- [14] 周晶,周蕾,刘超,等. 椎体 CT 值预测单纯斜外侧腰椎间融合术后融合器下沉[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2021,35(11):1449-1456.
- [15] CHEUNG K M, ZHANG Y G, LU D S, et al. Reduction of disc space distraction after anterior lumbar interbody fusion with autologous iliac crest graft[J]. *Spine*, 2003,28(13):1385-1389.
- [16] KALIYA-PERUMAL A K, SOH T L T, TAN M, et al. Fac-

tors influencing early disc height loss following lateral lumbar interbody fusion[J]. *Asian Spine J*, 2020,14(5):601-607.

- [17] STRUBE P, HOFF E K, SCHÜRINGS M, et al. Parameters influencing the outcome after total disc replacement at the lumbosacral junction. Part 2: Distraction and posterior translation lead to clinical failure after a mean follow-up of 5 years[J]. *Eur Spine J*, 2013,22(10):2279-2287.
- [18] ZHANG X Y, WU H, CHEN Y L, et al. Importance of the epiphyseal ring in OLIF stand-alone surgery: A biomechanical study on cadaveric spines[J]. *Eur Spine J*, 2021,30(1):79-87.
- [19] CHEN J D, LI J H, SHENG B, et al. Does preoperative morphology of multifidus influence the surgical outcomes of stand-alone lateral lumbar interbody fusion for lumbar spondylolisthesis? [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2022,215:107177.
- [20] WOO J B, SON D W, LEE S H, et al. Which factor can predict the effect of indirect decompression using oblique lumbar interbody fusion? [J]. *Medicine*, 2022,101(32):e29948.
- [21] KALICHMAN L, HUNTER D J. Lumbar facet joint osteoarthritis: A review[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2007,37(2):69-80.
- [22] NACHEMSON A. Lumbar intradiscal pressure. Experimental studies on post-mortem material[J]. *Acta Orthop Scand Suppl*, 1960,43:1-104.
- [23] YANG K H, KING A I. Mechanism of facet load transmission as a hypothesis for low-back pain[J]. *Spine*, 1984,9(6):557-565.
- [24] OKANO I, JONES C, RENTENBERGER C, et al. The association between endplate changes and risk for early severe cage subsidence among stand-alone lateral lumbar interbody fusion patients[J]. *Spine*, 2020,45(23):E1580-E1587.
- [25] SUN C, WANG H L, JIANG J Y, et al. The pathology of type II modic changes: Fat deposition or osteosclerosis? A study using CT scan[J]. *Biomed Res Int*, 2018,2018:6853720.

(本文编辑 范睿心 厉建强)

(上接第 251 页)

- [17] DU J, SUN B C, ZHAO X L, et al. Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by inducing epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2014,133(3):575-583.
- [18] CHEN Y, ZHANG L, LIU W X, et al. VEGF and SEMA4D have synergistic effects on the promotion of angiogenesis in epithelial ovarian cancer[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2018,23:2.
- [19] UCARYILMAZ METIN C, OZCAN G. The HIF-1 α as a potent inducer of the hallmarks in gastric cancer[J]. *Cancers*, 2022,14(11):2711.
- [20] RASHID M, ZADEH L R, BARADARAN B, et al. Up-down regulation of HIF-1 α in cancer progression[J]. *Gene*, 2021,798:145796.

- [21] ZHANG P C, LIU X, LI M M, et al. AT-533, a novel Hsp90 inhibitor, inhibits breast cancer growth and HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2-mediated angiogenesis in vitro and in vivo[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020,172:113771.
- [22] BURGER R A. Experience with bevacizumab in the management of epithelial ovarian cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2007,25(20):2902-2908.
- [23] WIMBERGER P, GERBER M J, PFISTERER J, et al. Bevacizumab may differentially improve prognosis of advanced ovarian cancer patients with low expression of VEGF-A165b, an antiangiogenic VEGF-A splice variant[J]. *Clin Cancer Res*, 2022,28(21):4660-4668.

(本文编辑 耿波)