

氧化苦参碱通过下调 miR-155-5p 对胃癌细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭作用

王斐斐¹, 李炜¹, 贺礼琴¹, 白昌儒¹, 董明清², 王娟毅^{1*}

1. 西安交通大学附属三二〇一医院 肿瘤内科, 陕西 汉中 723000

2. 空军军医大学 基础医学院, 陕西 西安 710032

摘要: **目的** 探讨氧化苦参碱通过调节 miR-155-5p 表达对胃癌细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭中的作用和其潜在机制。**方法** 使用 TRIzol 法提取组织标本和细胞系的总 RNA, 检测胃癌组织与癌旁组织中的 miR-155-5p 表达情况。采用 qRT-PCR 评估 miR-155-5p 在人胃癌细胞系 (SGC7901、MGC803) 与正常胃黏膜上皮 (GES-1、AGS) 细胞中的表达情况。将 MGC803 分为空白组、转染错义序列 siRNA 组、miR-155-5p 模拟物组、miR-155-5p 抑制剂组、氧化苦参碱 (100 $\mu\text{mol/L}$) 组、氧化苦参碱+miR-155-5p 模拟物组。采用 MTT 法观察不同干预下胃癌细胞的生长抑制作用, 用细胞集落形成试验检测不同干预下胃癌细胞的增殖情况。用流式细胞技术分析不同干预对胃癌细胞凋亡的影响。Transwell 法检测不同干预后胃癌细胞的迁移、侵袭情况。蛋白质印迹法检测 MGC803 细胞中 Claudin 1、c-Myc、cyclin D1、Bcl-2、Caspase-3 蛋白的相对表达量。**结果** 与癌旁组织和胃黏膜细胞 (GES-1、AGS) 相比, 在胃癌组织和胃癌细胞系 (SGC7901、MGC803) 中 miR-155-5p 相对表达量升高 ($P<0.001$)。而氧化苦参碱通过调节 miR-155-5p 表达抑制胃癌细胞生长。MTT 实验表明, miR-155-5p 模拟物的转染后 MGC803 细胞活力显著增加, 而氧化苦参碱可显著抑制胃癌细胞、转染和 miR-155-5p 模拟物的细胞活力 ($P<0.001$)。与空白组、错义序列 siRNA 组相比, miR-155-5p 模拟物转染后 MGC803 细胞活力显著增加, 细胞集落生成增加, 而氧化苦参碱可显著抑制胃癌细胞的活力和转染 miR-155-5p 模拟物的细胞活力, 及细胞集落生成数 ($P<0.001$)。miR-155-5p-模拟物组的细胞迁移和侵袭细胞数显著增加、凋亡比例降低, 而氧化苦参碱组和 miR-155-5p-抑制剂组细胞迁移和侵袭细胞数量降低、凋亡比例升高 ($P<0.001$)。miR-155-5p 模拟组的 Claudin 1、c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2 相对表达量增加, 而 Caspase-3 相对表达量降低 ($P<0.01$ 、 0.001)。而 miR-155-5p 抑制剂组、氧化苦参碱组和氧化苦参碱+miR-155-5p 抑制剂组的 Claudin 1、c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2 表达较 miR-155-5p 模拟组显著下降, Caspase-3 表达增加 ($P<0.001$)。**结论** miR-155-5p 可能是胃癌的治疗靶点, 氧化苦参碱可通过 miR-155-5p 的调节作用发挥抗肿瘤作用。

关键词: 氧化苦参碱; 胃癌; 细胞增殖; 凋亡; 封闭蛋白 1; 半胱氨酸蛋白酶 3

中图分类号: R966; R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)07-1567-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.07.003

Oxymatrine inhibits the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of gastric cancer cells by downregulating miR-155-5p

WANG Fei-fei¹, LI Wei¹, HE Li-qin¹, BAI Chang-ru¹, DONG Ming-qing², WANG Juan-yi¹

1. Department of Medical oncology, 3201 Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University, Hanzhong 723000, China

2. School of Basic Medicine, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: Objective To investigate the role and potential mechanism of oxymatrine in regulating the expression of miR-155-5p in the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of gastric cancer cells. **Method** Total RNA from tissue specimens and cell lines was extracted by TRIzol method, to detect the expression of miR-155-5p in gastric cancer tissues and adjacent tissues. The expression of miR-155-5p in human gastric cancer cell lines (SGC7901, MGC803) and normal gastric mucosal epithelial cells (GES-1, AGS) was evaluated by qRT-PCR. MGC803 was divided into blank group, transfected missense sequence siRNA group, miR-155-5p simulant group, miR-155-5p inhibitor group, oxymatrine (100 $\mu\text{mol/L}$) group, and oxymatrine + miR-155-5p mimics group. MTT assay was

收稿日期: 2023-05-08

基金项目: 三二〇一医院科研基金资助项目 (3201yk201530)

作者简介: 王斐斐, 男, 主治医师。E-mail: doctorgao1022@126.com

*通信作者: 王娟毅, 主任医师, 博士研究生。E-mail: vicent8752@163.com

used to observe the growth inhibition of gastric cancer cells under different interventions, and colony formation assay was used to detect the proliferation of gastric cancer cells under different interventions. Effects of different interventions on apoptosis of gastric cancer cells were analyzed by flow cytometry. The migration and invasion of gastric cancer cells after different interventions were detected by Transwell method. The relative expression levels of Claudin 1, c-Myc, Cyclin D1, Bcl-2, and Caspase-3 in MGC803 cells were detected by Western blotting. **Results** The relative expression of miR-155-5p was increased in gastric cancer tissues and gastric cancer cell lines (SGC7901, MGC803) compared with para-cancerous tissues and gastric mucosa cells (GES-1, AGS) ($P < 0.001$). Oxymatrine inhibited the growth of gastric cancer cells by regulating the expression of miR-155-5p. MTT assay showed that MGC803 cell viability was significantly increased after transfection with miR-155-5p mimicry, and the cell viability of gastric cancer cells, transfection and miR-155-5p mimicry was significantly inhibited by oxymatrine ($P < 0.001$). Compared with blank group and missense sequence siRNA group, MGC803 cell viability and colony generation were significantly increased after transfection with miR-155-5p mimics, while oxymatrine significantly inhibited the viability of gastric cancer cells, the cell viability and colony generation number of transfected miR-155-5p mimics ($P < 0.001$). The number of cell migration and invasion cells increased significantly and the proportion of apoptosis decreased in the miR-155-5p simulant group, while the number of cell migration and invasion cells decreased and the proportion of apoptosis increased in the oxymatrine and miR-155-5p- inhibitor groups ($P < 0.001$). The relative expressions of Claudin 1, c-Myc, Cyclin D1, and Bcl-2 in miR-155-5p simulant group were increased, while the relative expressions of Caspase-3 were decreased ($P < 0.01, 0.001$). The expressions of Claudin 1, c-Myc, Cyclin D1, and Bcl-2 in miR-155-5p inhibitor group, oxymatrine group, and oxymatrine + miR-155-5p inhibitor group were significantly decreased compared with those in miR-155-5p simulant group, and the expression of Caspase-3 was increased ($P < 0.001$). **Conclusion** MiR-155-5p may be a therapeutic target for gastric cancer, and oxymatrine can exert anti-tumor effects through the regulatory effect of miR-155-5p.

Key words: oxymatrine; gastric cancer; cell proliferation; apoptosis; Claudin 1; Caspase-3

胃癌是我国发病率第 5 位的肿瘤,也是导致肿瘤相关死亡的第 3 大原因^[1]。超过 90%的胃癌患者在诊断时已出现远处转移^[2]。放疗、化疗、靶向治疗是出现转移胃癌的主要治疗方法,但化疗药物特异性较低,且不良反应明显^[3-4]。因此,寻找更为安全高效的治疗药物具有重要意义。

氧化苦参碱是从苦参干燥根、果实中提取的一种醌类生物碱,是苦参碱的主要有效成分,具有抗炎、抗肿瘤等多种药理作用^[5-6]。研究表明,氧化苦参碱是一种天然抗癌药物,能够显著抑制癌细胞增殖、影响多种恶性肿瘤的发生和进展^[6]。已证实,氧化苦参碱可对胃癌 BGC-823 细胞及胃癌 HGC-27 细胞裸鼠移植瘤模型发挥抑制生长作用^[7-8]。课题组前期也报道了苦参碱可通过血管内皮生长因子-C (VEGF-C)/血管内皮生长因子受体 3 (VEGFR3) 和核因子- κ B (NF- κ B)/Toll 样受体 4 (TLR4) 信号通路保护大鼠的胃黏膜损伤^[9]。最近研究表明,氧化苦参碱可以通过调节 microRNA (miRNA) 的表达来发挥其抗肿瘤作用^[10-11]。miRNA 是内源性单链非编码 RNA,与靶 miRNA 的 3 个非翻译区域结合,可以在转录后水平调节基因表达。研究表明,miR-155-5p 在肝癌、食管癌等消化系统肿瘤中高度表达,并且与预后不良相关^[12-13]。然而,目前尚不清楚 miR-155-5p 是否在胃癌中过度表达,以及氧化

苦参碱是否可通过调节 miR-155-5p 在胃癌中的表达以抑制肿瘤进展。基于此,本研究探讨了氧化苦参碱对胃癌细胞中 miR-155-5p 表达、胃癌细胞生物学行为及 miR-155-5p 靶基因对封闭蛋白 1 (Claudin 1)、半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 和 c-Myc 表达的影响,为胃癌治疗的新药物研发和新靶点的确立提供参考。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

人胃癌细胞系 SGC7901、MGC803 和正常胃黏膜 GES-1、AGS 细胞系购自中国科学院上海细胞库。错义序列 siRNA、miR-155-5p-模拟物和 miR-155-5p-抑制剂由宝日医生物技术(北京)有限公司合成。RNA 分子序列如下: miR-155-5p 模拟物, 5'-UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU-3', miR-155-5p 抑制剂, 5'-ACCCCUAUCACAUUAGCAUU AA-3', 错义序列 siRNA, 5'-CCCUAUCACAAUUA GCAUUAUU-3'。氧化苦参碱购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号 A111285,纯度为分析标准品。

MTT 和 0.1%结晶紫溶液染色购自北京索莱宝科技有限公司,胎牛血清购自美国 Gibco 公司。Claudin 1 抗体(货号 ab211737)、c-Myc 抗体(货号 ab32072)、Cyclin D1 抗体(货号 ab16663)、抗

B 细胞淋巴瘤/白血病基因 2 (Bcl-2) 抗体 (货号 ab203516)、抗胱天蛋白酶 3 (Caspase-3) 抗体 (货号 ab184787) 购自 Abcam 公司。ECL 试剂盒和 Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 凋亡检测试剂盒购自美国 Becton Dickinson 公司。4%多聚甲醛购自广州硕谱生物科技有限公司。LipofectAMINE 2000 转染试剂、Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, Transwell 小室、Matrigel 基质胶购自美国 Corning 公司。

Image-Pro Plus 数码医学图像分析系统购自北京麦克奥迪仪器仪表公司, CKX53 光学显微镜购自日本 Olympus 公司, FACSCanto 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 组织收集

收集 2020 年 1 月—2022 年 12 月西安交通大学附属三二 O 一医院进行外科手术切除的 50 例胃癌组织标本和健康癌旁组织, 包括 36 例男性和 14 例女性, 所有患者术前均未接受放疗、化疗、靶向治疗或其他抗癌治疗。组织保存于液氮中备测。本研究经西安交通大学附属三二 O 一医院医学伦理委员会批准 (批号 IRB20200017), 患者均知情同意。

1.3 细胞培养、转染和分组

人胃癌细胞系 SGC7901、MGC803 和正常胃黏膜上皮 GES-1、AGS 细胞在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中进行培养, 每 3 天更换 1 次培养液, 取对数生长期细胞进行后续实验。

将细胞分为空白组、转染错义序列 siRNA 组、miR-155-5p 模拟物组、miR-155-5p 抑制剂组、氧化苦参碱组、氧化苦参碱+miR-155-5p 抑制物组。

1.4 qRT-PCR 法检测细胞系和组织中 miR-155-5p 水平

根据操作说明, 使用 TRIzol 法提取组织标本和细胞系的总 RNA, 使用反转录试剂盒生成 cDNA, 并以此为模板进行实时荧光定量 PCR 检测靶基因的表达。使用靶基因 C_t 值法对基因相对表达进行定量。使用 U6 作为内参分析 miR-155-5p 的表达。miR-155-5p 引物序列为 5'-TTAATGCTAATCGTGA TAGGGGT-3', U6 引物序列为 5'-CTCGCTTCGGC AGCACATATACT-3'。

分别用 miR-155-5p 模拟物转染 SGC7901、MGC803、GES-1、AGS 细胞, 然后使用 qRT-PCR 筛选 miR-155-5p 相对表达水平最高的细胞系进行后续实验。并用不同浓度 (25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)

氧化苦参碱干预转染 miR-155-5p 模拟物的 MGC803 细胞, 在孵育 24 h 后利用 qRT-PCR 筛选出最佳氧化苦参碱干预浓度。

1.5 MTT 法测定检测 miR-155-5p 和氧化苦参碱对胃癌细胞增殖的影响

根据 LipofectAMINE 2000 转染试剂说明, 分别将转染错义序列 siRNA、miR-155-5p 模拟物、miR-155-5p 抑制剂转染 MGC803 细胞。氧化苦参碱+miR-155-5p 模拟物组细胞为转染 miR-155-5p 模拟物的 MGC803 细胞与氧化苦参碱孵育 24 h 后进行测定。将空白组、转染错义序列 siRNA 组、miR-155-5p 模拟物组、miR-155-5p 抑制剂组、氧化苦参碱组、氧化苦参碱+miR-155-5p 抑制物组生长良好的细胞接种到 96 孔板 (3 000 个细胞/孔) 中。将 0.1 mg/mL MTT 试剂加入到培养基中继续培养 4 h。之后向细胞中加入 DMSO (150 μL /孔), 摇震 10 min 后, 使用酶标仪测量 490 nm 处吸光度 (A) 值, 并计算细胞抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{各组}} / A_{\text{空白}}$$

1.6 细胞集落形成实验测定 miR-155-5p 和氧化苦参碱对胃癌细胞增殖的影响

将空白组、错义序列组、miR-155-5p 模拟物组、miR-155-5p 抑制剂组、氧化苦参碱组、氧化苦参碱+miR-155-5p 抑制物组的细胞接种在 100 mm 培养皿 (2 000 个细胞/皿) 中, 给药同 1.5 项下。每 3 天更换 1 次培养基, 并使细胞生长 12 d 以形成菌落。细胞集落通过 4%多聚甲醛固定, 后用 0.1%结晶紫溶液染色, 计数细胞数 > 50 的集落。

1.7 流式细胞法检测 miR-155-5p 和氧化苦参碱对胃癌细胞凋亡的影响

收集各组细胞并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下使用 PBS 漂洗 2 遍。根据 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒操作说明, 将各组细胞悬浮在 100 μL Annexin V 缓冲液中, 并将加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶染色液到细胞悬液中。在室温下于黑暗中孵育 20 min, 然后使用 FACSCanto 流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.8 Transwell 实验检测 miR-155-5p 和氧化苦参碱对胃癌细胞迁移和侵袭作用的影响

在 8 μm 滤膜孔的 Transwell 小室中测量细胞侵袭作用。侵袭作用检测: Transwell 过程按照操作说明进行, 在包含 Matrigel 基质胶的 Transwell 上室添加 200 μL 细胞, 上室和下室中分别加入 200 μL 无血清培养基和 600 μL 20% FBS 的培养基并在

37 ℃下孵育 24 h。用 PBS 洗涤后,用 4%多聚甲醛固定 1 h,并用 0.1%结晶紫溶液染色 15 min。冲洗掉多余的染料,并在 400 倍的显微镜下随机选择 5~10 个区域对细胞进行拍照。迁移实验时不添加 Matrigel 基质胶。

1.9 蛋白质印迹法检测 Claudin 1、c-Myc、cyclin D1、Bcl-2、Caspase-3 蛋白的表达

收集各组细胞,分别提取总蛋白质,并用 BCA 法测定蛋白水平。其中蛋白质样品(20 μg)通过 8% SDS-PAGE 分离,后恒流转至 PVDF 膜上。再在室温用 5%脱脂牛奶封闭封闭条带 3 h,之后分别加入 Claudin 1 抗体(1:1 000)、Caspase-3 抗体(1:1 000)、Bcl-2 抗体(1:1 000)、c-Myc 抗体(1:1 000)和 GAPDH(1:1 000)在 4 ℃下孵育过夜,然后与辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:2 000)在室温下孵育 1 h。以 GAPDH 灰度值为内参,用 Image J 软件对不同蛋白的相对表达量进行定量分析。

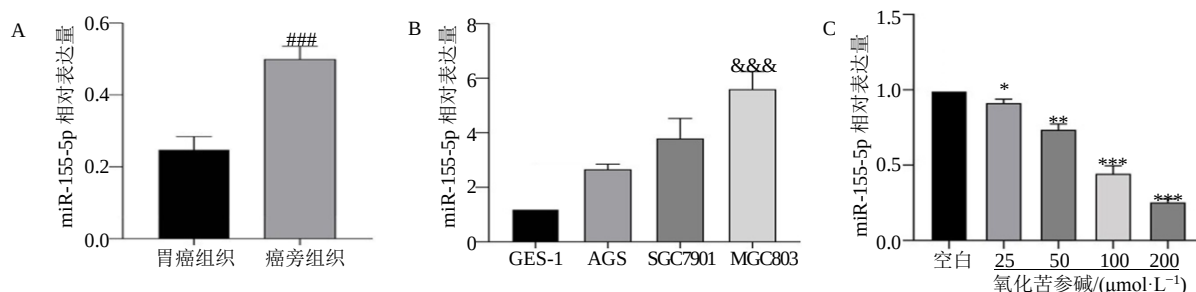
1.10 统计学分析

研究数据使用 SPSS 22 软件进行统计分析。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 进行,多组间差异使用 ANOVA 方差分析进行,两两比较使用 SNK 法。

2 结果

2.1 miR-155-5p 在胃癌组织和细胞中的表达情况

qRT-PCR 结果显示,与癌旁组织和胃黏膜细胞(GES-1 和 AGS 细胞)相比,在胃癌组织和胃癌细胞系 MGC803 中 miR-155-5p 相对表达量显著升高($P < 0.001$),见图 1A、B。由于 MGC803 细胞中 miR-155-5p 相对表达量最高,因此后续研究使用此细胞进行。不同浓度氧化苦参碱与转染 miR-155-5p 模拟物的 MGC803 细胞培养 24 h 后,miR-155-5p 的表达随着氧化苦参碱剂量增加而降低($P < 0.05$ 、0.01、0.001),见图 1C。经预实验,氧化苦参碱干预 MGC803 细胞的最佳浓度为 100 μmol/L,此浓度下细胞抑制率为 $(47.34 \pm 2.44) \%$ 。



A-miR-155-5p 在胃癌组织和癌旁组织中的相对表达量 B-miR-155-5p 在不同细胞系中的相对表达量 C-不同浓度的氧化苦参碱处理 MGC803 胃癌细胞后 miR-155-5p 的表达情况 与胃癌组织比较: ### $P < 0.001$; 与 GES-1 细胞组比较: &&& $P < 0.001$; 与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

A-relative expression of miR-155-5p in gastric cancer tissues and adjacent tissues B-relative expression of miR-155-5p in different cell lines C-expression of miR-155-5p in MGC803 gastric cancer cells treated with oxymatrine at different concentrations ### $P < 0.001$ vs gastric cancer group; &&& $P < 0.001$ vs GES-1 cell group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs blank group

图 1 miR-155-5p 在胃癌组织、癌旁组织和不同细胞系中的表达差异 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 miR-155-5p Expression differences in gastric cancer tissues, paracancer tissues, and different cell lines ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.2 氧化苦参碱对胃癌细胞增殖的影响

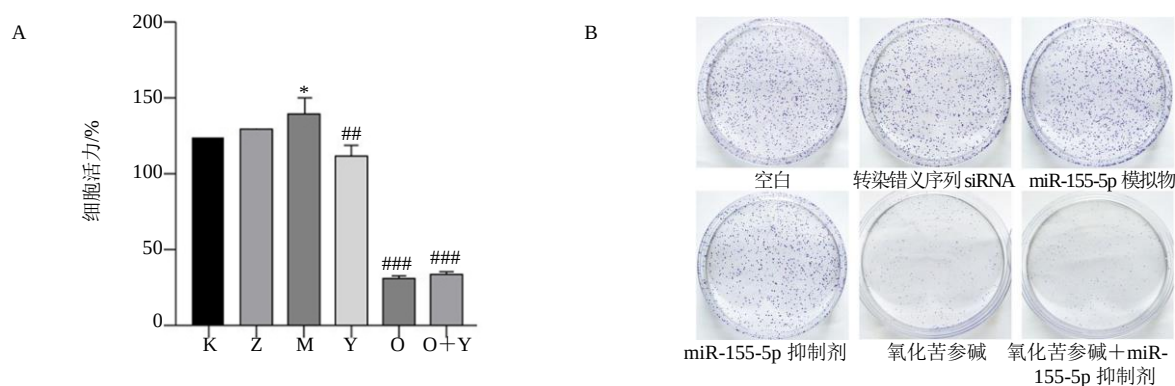
MTT 实验表明,与空白组、转染错义序列 siRNA 组相比,miR-155-5p 模拟物的转染后 MGC803 细胞活力显著增加($P < 0.05$);而 miR-155-5p 抑制剂组、氧化苦参碱组、氧化苦参碱+miR-155-5p 抑制剂组均可显著抑制胃癌细胞和转染 miR-155-5p 模拟物细胞活力($P < 0.01$ 、0.001),见图 2A。

细胞集落形成实验中发现,miR-155-5p 模拟物转染后 MGC803 细胞集落生成增加,而 miR-155-5p 抑制剂组、氧化苦参碱组、氧化苦参碱+miR-155-

5p 抑制剂组处理后的胃癌细胞与 miR-155-5p 模拟物的转染后 MGC803 细胞相比,集落显著被抑制,见图 2B。

2.3 氧化苦参碱对胃癌细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示,与转染错义序列 siRNA 组相比,miR-155-5p 模拟组胃癌细胞凋亡率降低($P < 0.01$),而 miR-155-5p 抑制剂组、氧化苦参碱组、氧化苦参碱+miR-155-5p 抑制剂组可显著增加胃癌细胞凋亡比例,同样可以增加转染 miR-155-5p-模拟物的胃癌细胞凋亡($P < 0.01$ 、0.001),见图 3。

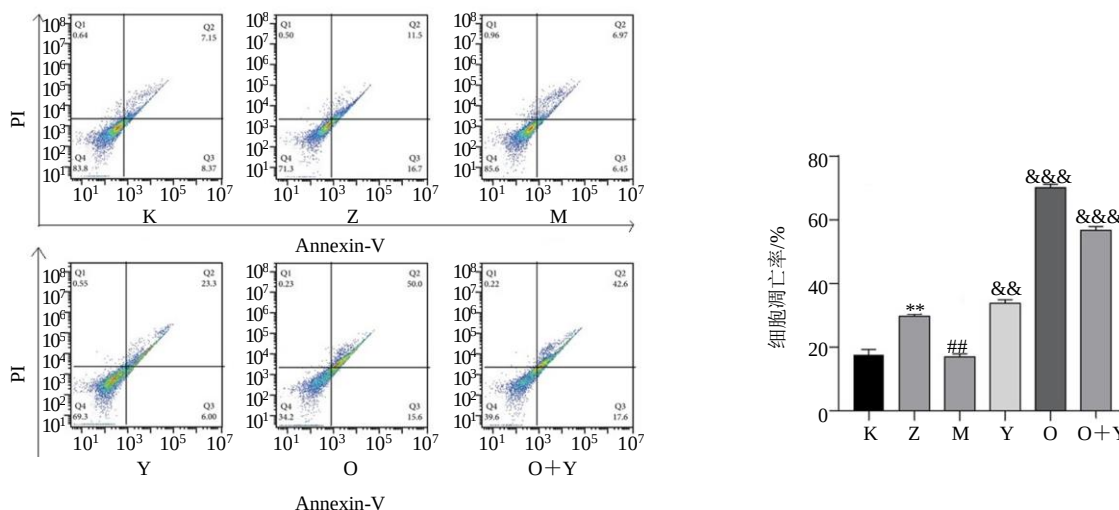


A-MTT 测定法检测 MGC803 细胞活力 B- MGC803 细胞集落形成情况 K-空白 Z-转染错义序列 siRNA M-miR-155-5p 模拟物 Y-miR-155-5p 抑制剂 O-氧化苦参碱 O+Y-氧化苦参碱+miR-155-5p 抑制剂 与空白组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-155-5p 模拟物组比较: ### $P < 0.001$

A-Detection of MGC803 cell viability by MTT assay B-MGC803 cell colony formation K-blank Z-transfected missense sequence siRNA M-miR-155-5p simulant Y-miR-155-5p inhibitor O- oxymatrine O + Y- oxymatrine + miR-155-5p inhibitor * $P < 0.05$ vs blank group; ### $P < 0.001$ vs miR-155-5p simulant group

图 2 氧化苦参碱对胃癌细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of oxymatrine on proliferation of gastric cancer cells



K-空白 Z-转染错义序列 siRNA M-miR-155-5p 模拟物 Y-miR-155-5p 抑制剂 O-氧化苦参碱 O+Y-氧化苦参碱+miR-155-5p 抑制剂 与空白组比较: ** $P < 0.01$; 与转染错义序列 siRNA 组比较: ## $P < 0.01$; 与 miR-155-5p 模拟物组比较: && $P < 0.01$ &&& $P < 0.001$

K-blank Z-transfected missense sequence siRNA M-miR-155-5p simulant Y-miR-155-5p inhibitor O- oxymatrine O + Y- oxymatrine + miR-155-5p inhibitor ** $P < 0.01$ vs blank group; ## $P < 0.01$ vs transfected missense sequence siRNA group; && $P < 0.01$ &&& $P < 0.001$ vs miR-155-5p simulant group

图 3 氧化苦参碱对胃癌细胞的凋亡作用

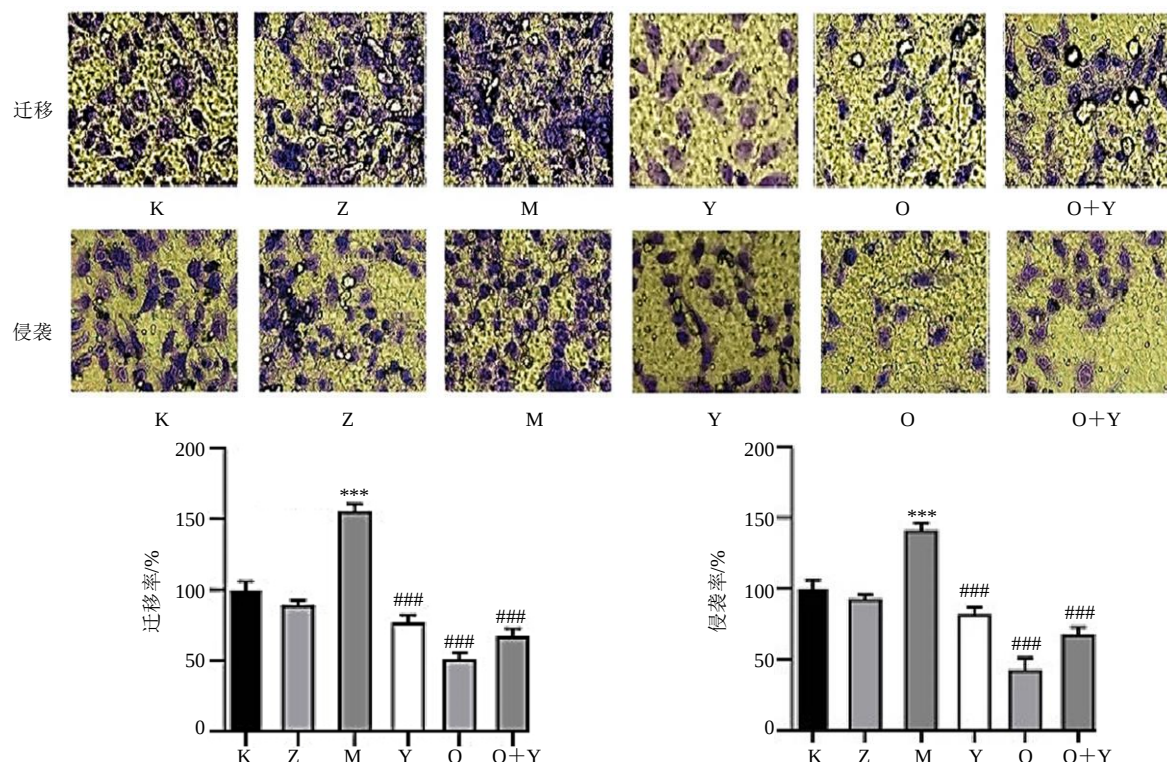
Fig. 3 Effect of oxymatrine on apoptosis of gastric cancer cells

2.4 氧化苦参碱对胃癌细胞迁移和侵袭的影响

Transwell 实验结果显示,与空白组、转染错义序列 siRNA 组相比,miR-155-5p-模拟物组的细胞迁移和侵袭细胞数显著增加 ($P < 0.001$),而 miR-155-5p 抑制剂组、氧化苦参碱组、氧化苦参碱+miR-155-5p 抑制剂组细胞迁移和侵袭细胞数量降低 ($P < 0.001$),见图 4。

2.5 氧化苦参碱对 miR-155-5p 靶基因和细胞周期蛋白表达的影响

使用蛋白质印迹法检测分析显示,与空白组、错义序列组相比,miR-155-5p 模拟组的 Claudin 1、c-Myc、Cyclin D1、Bcl-2 相对表达量增加,而 Caspase-3 相对表达量降低 ($P < 0.01, 0.001$)。miR-155-5p 抑制剂组、氧化苦参碱组和氧化苦参碱+



K-空白 Z-转染错义序列 siRNA M-miR-155-5p 模拟物 Y-miR-155-5p 抑制剂 O-氧化苦参碱 O+Y-氧化苦参碱+miR-155-5p 抑制剂 与空白组比较: *** $P < 0.001$; 与 miR-155-5p 模拟物组比较: ### $P < 0.001$

K-blank Z-transfected missense sequence siRNA M-miR-155-5p simulant Y-miR-155-5p inhibitor O-oxymatrine O+Y-oxymatrine + miR-155-5p inhibitor *** $P < 0.001$ vs blank group; ### $P < 0.001$ vs miR-155-5p simulant group

图 4 Transwell 法检测氧化苦参碱对 MGC803 细胞的迁移和侵袭的影响 (×400)

Fig. 4 Effects of oxymatrine on migration and invasion of MGC803 cells by Transwell assay (×400)

miR-155-5p 模拟组的 Claudin 1、c-Myc、Cyclin D1 和 Bcl-2 表达较 miR-155-5p 模拟组下降, Caspase-3 表达增加 ($P < 0.001$), 见图 5。

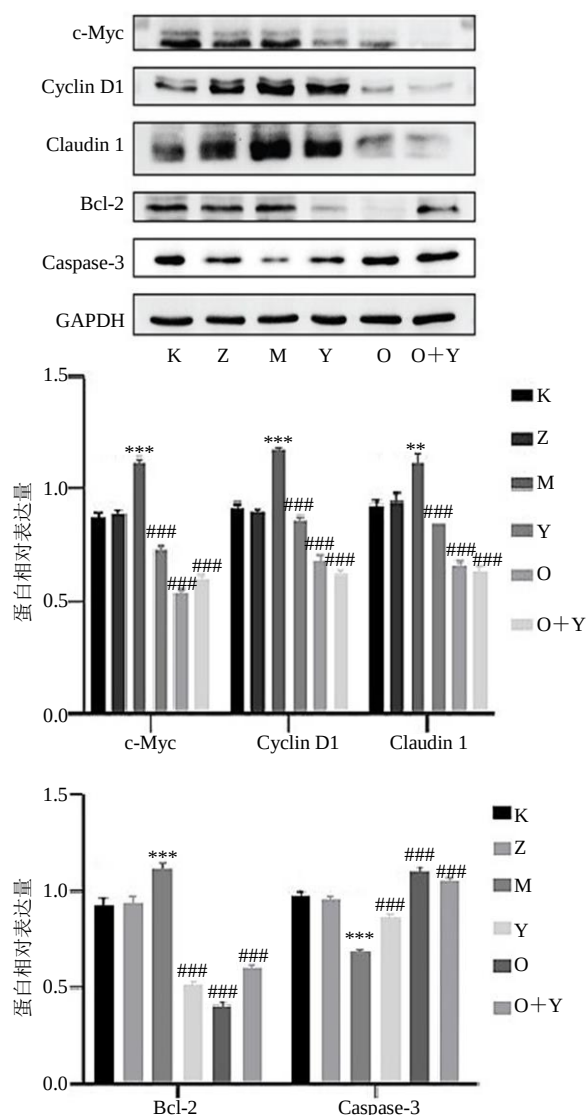
3 讨论

胃癌是一种发病机制相对复杂的恶性肿瘤, 其中遗传因素涉及原癌基因激活、抑癌基因失活, 以及相关信号通路的异常调节等多个方面^[3]。对胃癌进展的机制研究有利于阐明其发病原因, 并对开发更有效的新药以提高疗效具有重要意义。氧化苦参碱是一种多靶点抗肿瘤药物, 越来越多的研究已经表明了其在不同肿瘤类型中的抗肿瘤作用^[5, 14-15]。目前已经在体内和体外研究中均证实了氧化苦参碱可抑制胃癌细胞生长、降低细胞的存活率、诱导胃癌细胞的凋亡^[7-8]。近年来研究表明, 苦参碱衍生物可在肝细胞癌中通过磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt) 通路抑制细胞生长, 促进细胞凋亡^[16]。还可通过 Wnt/ β -连环蛋白 (Wnt/ β -catenin) 信号通路增加肺癌细胞的放疗敏感性^[17]。

然而, 氧化苦参碱能否直接抑制胃癌中的 miR-155-5p 的表达仍未知。

人类已经发现了近 3 000 种 miRNA, 根据推测 miRNA 可能调节人类一半以上的基因表达。在过去的几十年里, miRNA 在癌症生物学中的作用得到了广泛的研究。一些 miRNA 参与肿瘤细胞侵袭和转移, 而一些 miRNA 则与癌症患者的预后密切相关, 因此 miRNA 已经成为肿瘤诊断和干预靶点的研究热点^[18]。本研究中探讨了氧化苦参碱通过调节胃癌中的 miR-155-5p 表达水平, 干预胃癌细胞的生物学行为作用。通过比较 miR-155-5p 在胃癌组织和癌旁组织、胃癌细胞系和正常胃黏膜细胞系中表达可见, 胃癌细胞中 miR-155-5p 表达显著升高, 这与既往研究类似^[19]。本研究选用了胃癌细胞系中 miR-155-5p 表达最高的 MGC803 细胞进行了后续研究。

加速细胞周期进程是大多数实体瘤的共同特征。为了证明 miR-155-5p 过表达可以加速细胞周期, 本研究分析过表达或抑制 miR-155-5p 表达对胃



K-空白 Z-转染错义序列 siRNA M-miR-155-5p 模拟物 Y-miR-155-5p 抑制剂 O-氧化苦参碱 O+Y-氧化苦参碱+miR-155-5p 抑制剂

与空白组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 miR-155-5p 模拟物组比较: ### $P < 0.001$

K-blank Z-transfected missense sequence siRNA M-miR-155-5p simulant Y-miR-155-5p inhibitor O- oxymatrine O + Y-oxymatrine + miR-155-5p inhibitor

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs blank group; ### $P < 0.001$ vs miR-155-5p simulant group

图 5 氧化苦参碱对 MGC803 细胞中 miR-155-5p 靶基因蛋白的表达

Fig. 5 Expression of miR-155-5p target gene protein in MGC803 cells induced by oxymatrine

癌细胞影响可见, miR-155-5p 过表达可促进胃癌细胞增殖、迁移和侵袭, 并抑制细胞凋亡。根据文献报道, miR-155-5p 可能在胃癌细胞中作为肿瘤启动子起作用^[19]。而使用氧化苦参碱干预后发现, 氧化

苦参碱可降低胃癌细胞增殖、迁移和侵袭, 并促进细胞凋亡。此外氧化苦参碱可以降低 miR-155-5p 模拟物对胃癌细胞的恶性生物学行为。

参考相关文献后, 本研究选择了 miR-155-5p 3 个候选靶基因, 即 Claudin 1、Caspase-3、c-Myc。Claudin 1 是细胞紧密连接的重要组成部分, 在许多不同的肿瘤中异常表达。在肝细胞癌中, 角蛋白 8 和角蛋白 18 的缺失通过上调 Claudin 2 表达促进 HepG1 细胞的增殖、侵袭和转移^[20]。c-Myc 作为转录因子, 在控制细胞生长、活力、凋亡和细胞转化中起着重要的作用^[21]。此外, 细胞周期蛋白 D1 在癌症发病机制中发挥关键作用, 其上调表达驱动不受控制的细胞增殖^[22]。在本研究结果中, 与空白组相比, miR-155-5p 模拟物组中 Claudin、cyclin D、c-Myc 的表达水平上调, 表明 miR-155-5p 在细胞周期的启动和进展中起重要作用。当 c-Myc 表达受到抑制时, 细胞生长受阻, 细胞在细胞周期的 G0/G1 期积累, 导致细胞凋亡加速。细胞凋亡是一个平衡细胞存活和死亡的稳态过程^[23]。Caspase-3 的激活是细胞凋亡的关键过程, Caspase-3 活性增加被认为是细胞凋亡的标志物。Bcl-2 参与凋亡途径, 在控制细胞凋亡和增强细胞存活率方面具有一定意义^[23]。本研究表明, 氧化苦参碱可通过 miR-155-5p 调节可抑制 c-Myc、Caspase-3、Bcl-2 表达促进细胞凋亡。

综上所述, 本研究发现了胃癌细胞中 miR-155-5p 中过度表达, 氧化苦参碱可能通过 miR-155-5p 分子靶点发挥抗肿瘤作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cao W, Chen H D, Yu Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(7): 783-791.
- [2] 中国抗癌协会胃癌专业委员会. 胃癌诊治难点中国专家共识 (2020 版) [J]. *中国实用外科杂志*, 2020, 40(8): 869-904.
- [3] Onoyama T, Ishikawa S, Isomoto H. Gastric cancer and genomics: review of literature [J]. *J Gastroenterol*, 2022, 57(8): 505-516.
- [4] Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2021 (6th edition) [J]. *Gastric Cancer*, 2023, 26(1): 1-25.
- [5] 刘晶晶, 牟艳玲. 苦参碱抗肿瘤作用机制的研究进展

- [J]. 中国药房, 2017, 28(19): 2707-2711.
- [6] 曹建, 魏润杰, 邓茹芸, 等. 苦参碱及氧化苦参碱抑制肿瘤作用机制研究进展及展望 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 753-760.
- [7] 房伟, 马世勋, 马云涛, 等. 氧化苦参碱诱导胃癌 BGC-823 细胞发生 caspase-12 依赖性内质网应激凋亡的机制研究 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2019, 26(4): 399-404.
- [8] 黄义新, 刘炜. 氧化苦参碱联合紫杉醇对人胃癌细胞 HGC-27 和裸鼠移植瘤模型的抑制作用 [J]. 河北医药, 2022, 44(5): 655-658.
- [9] 王娟毅, 柳仲秋, 李炜, 等. 苦参碱减轻 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG) 诱导的大鼠胃黏膜损伤及机制 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36(2): 157-163.
- [10] 胡柏帆, 章雪莲, 黄佼, 等. 苦参碱调控 circ0013958/miR-532-3p 轴对卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(24): 6089-6093.
- [11] Li S, Zhang H, Jiao Y, *et al.* Oxymatrine induces anti-tumor response in cervical cancer by modulating circ_0008460/miR-197-3p/ribonucleotide reductase subunit M2 (RRM2) [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5): 12912-12926.
- [12] 喻茂文, 黄淑彬, 陈永刚. miR-155-5p 在肝细胞癌中的表达及其作用机制 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2021, 31(2): 130-134.
- [13] 饶雯清, 林征, 刘双, 等. 食管鳞状细胞癌患者血清分泌体 miRNA-155-5p 表达与预后的相关性分析 [J]. 肿瘤研究与临床, 2021, 33(2): 87-92.
- [14] 张明发, 沈雅琴. 氧化苦参碱抗上消化系肿瘤作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(5): 964-968.
- [15] 毛俐, 汪广杰, 张鑫, 等. 氧化苦参碱及苦参碱 Au(III) 金属配合物对肿瘤细胞增殖的影响及分子机制初探 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 639-646.
- [16] 王湘, 张森, 韩科研, 等. 苦参碱衍生物 ZS10 基于 PI3K/AKT 信号通路诱导人肝癌细胞 BEL-7402 凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(1): 116-124.
- [17] 李修炜, 王记南, 张健. 基于 PAK6 和 Wnt/ β -catenin 信号通路的苦参碱对肺癌放疗敏感性的影响研究 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 447-453.
- [18] Ho P T B, Clark I M, Le L T T. MicroRNA-based diagnosis and therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7167.
- [19] Li S, Zhang T, Zhou X, *et al.* The tumor suppressor role of miR-155-5p in gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(2): 2709-2714.
- [20] Wu X, Xiao J, Zhao C, *et al.* Claudin1 promotes the proliferation, invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma cells by upregulating the expression and nuclear entry of β -catenin [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(4): 3445-3451.
- [21] Kido T, Lau Y C. Androgen receptor variant 7 exacerbates hepatocarcinogenesis in a c-MYC-driven mouse HCC model [J]. *Oncogenesis*, 2023, 12(1): 4.
- [22] Qie S, Diehl J A. Cyclin D degradation by E3 ligases in cancer progression and treatment [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67(Pt 2): 159-170.
- [23] Zhu Y, Xie N, Chai Y, *et al.* Apoptosis induction, a sharp edge of berberine to exert anti-cancer effects, focus on breast, lung, and liver cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 803717.

[责任编辑 高源]