

• 实验研究 •

松果菊苷通过 circ_0046264/miR-510/OPCML 对皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖、凋亡的影响

王康民¹, 刘学伟², 王秀菊¹, 时晓玉¹, 于小璇¹

1. 郑州颐和医院 皮肤科, 河南 郑州 450000

2. 河南中医药大学第一附属医院 皮肤科, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 探讨松果菊苷对皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖及凋亡的影响及其作用机制。方法 体外培养人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞, 采用不同质量浓度 (12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/L}$) 的松果菊苷处理 A431 细胞。将 circ_0046264 对照空载体 (pcDNA)、circ_0046264 过表达载体 (pcDNA-circ_0046264)、miR-510 寡核苷酸阴性对照 (anti-miR-NC)、miR-510 寡核苷酸抑制物 (miR-510 inhibitor) 分别转染至 A431 细胞。将 circ_0046264 小分子干扰 RNA (si-circ_0046264)、miR-510 寡核苷酸模拟物 (miR-510 mimic) 分别转染至 A431 细胞后加入 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 松果菊苷进行处理。采用 MTT 法、平板克隆形成实验与流式细胞术分别检测细胞增殖、克隆形成及凋亡率; qRT-PCR 法与 Western blotting 法分别检测 circ_0046264、miR-510、阿片样物质结合蛋白 (OPCML) 的表达量; 双荧光素酶报告实验检测 circ_0046264 与 miR-510 的靶向关系, 以及 miR-510 与 OPCML 的靶向关系。结果 松果菊苷可浓度相关性地升高 A431 细胞增殖抑制率、凋亡率和 circ_0046264、OPCML 的表达量, 并可降低 miR-510 的表达量, 集落形成数减少 ($P < 0.05$)。转染 pcDNA-circ_0046264 或 miR-510 inhibitor 后, OPCML 蛋白表达显著升高, 细胞增殖抑制率和凋亡率显著升高, 集落形成数明显减少 ($P < 0.05$)。circ_0046264 可靶向调控 miR-510 的表达, OPCML 是 miR-510 的靶基因; 转染 si-circ_0046264 或 miR-510 mimic 均可降低松果菊苷对 A431 细胞增殖及凋亡的作用。结论 松果菊苷可通过调节 circ_0046264/miR-510/OPCML 表达而抑制皮肤鳞状细胞癌细胞增殖及诱导细胞凋亡。

关键词: 松果菊苷; 皮肤鳞状细胞癌; A431 细胞; circ_0046264 过表达载体; 阿片样物质结合蛋白; 细胞增殖; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)02-0230-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.02.002

Effects of echinoside on proliferation and apoptosis of cutaneous squamous cell carcinoma A431 cells by circ_0046264/miR-510/OPCML

WANG Kang-min¹, LIU Xue-wei², WANG Xiu-ju¹, SHI Xiao-yu¹, YU Xiao-xuan¹

1. Department of Dermatology, Zhengzhou Yihe Hospital, Zhengzhou 450000, China

2. Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of echinoside on proliferation and apoptosis of squamous cell carcinoma A431 cells and its mechanism. **Methods** Human squamous cell carcinoma A431 cells were cultured *in vitro* and treated with echinoside at different concentrations (12.5, 25.0, and 50.0 $\mu\text{g/L}$). pcDNA, pcDNA-circ_0046264, anti-miR-NC, and miR-510 inhibitor were transfected into A431 cells, respectively. si-circ_0046264 and miR-510 mimic were transfected into A431 cells and 50.0 $\mu\text{g/mL}$ echinoside was added. MTT assay, plate clonogenesis assay, and flow cytometry were used to detect cell proliferation, clonogenesis and apoptosis rates, respectively. The expression levels of circ_0046264, miR-510, and OPCML were detected by qRT-PCR and Western blotting method, respectively. The targeting relationship between circ_0046264 and miR-510, and the targeting relationship between miR-510 and OPCML were detected by dual-luciferase reporting assay. **Results** Echinosin increased proliferation inhibition and apoptosis rate, circ_0046264 and OPCML expression, decreased miR-510 expression level, and decreased colony formation number ($P < 0.05$). After transfection with pcDNA-circ_0046264 or miR-510 inhibitor, OPCML protein expression, cell proliferation inhibition rate, and apoptosis rate were significantly increased, and colony formation number was significantly decreased ($P < 0.05$).

收稿日期: 2021-08-15

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (LHGJ20191162)

作者简介: 王康民, 主治医师, 本科, 主要研究方向为皮肤科。E-mail: wkmhlj@126.com

circ_0046264 can regulate the expression of miR-510, and OPCML is the target gene of miR-510. Transfection with si-circ_0046264 or miR-510 mimic could reduce the proliferation and apoptosis of A431 cells. **Conclusion** Echinaside can inhibit proliferation and induce apoptosis of squamous cell carcinoma cells by regulating circ_0046264/miR-510/OPCML expression.

Key words: echinaside; cutaneous squamous cell carcinoma; circ_0046264; OPCML; cell proliferation; apoptosis

皮肤鳞状细胞癌是临床常见的一种恶性肿瘤,具有恶性程度高、转移能力强等特点,手术切除与放化疗等是其主要治疗手段,但患者预后较差,因而寻找安全低毒的药物具有重要意义^[1-3]。松果菊苷是从肉苁蓉中提取的一种苯乙醇苷类化合物,具有抗氧化、抗凋亡、抗癌等作用。研究表明松果菊苷可抑制乳腺癌细胞生长及转移,其作用机制与抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化有关^[4]。环状 RNA (circRNA) 是由外显子与内含子剪切形成的环状 RNA 分子,具有稳定性、保守性和组织特异性等特点,并与多种肿瘤发生发展密切相关。研究表明, circ_0046264 在非小细胞肺癌细胞中表达下调,上调其表达可抑制非小细胞肺癌细胞增殖、迁移及侵袭^[5]。Circular RNA Interactome 数据库预测显示, circ_0046264 与 miR-510 存在结合位点,研究表明 miR-510 在乳腺癌细胞中呈高表达,并可促进细胞生长^[6]。Targetscan 数据库预测显示, miR-510 与阿片样物质结合蛋白 (opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like, OPCML) 存在结合位点;研究表明 OPCML 在胃癌细胞中表达下调,上调其表达可抑制胃癌细胞增殖、迁移及侵袭^[7]。但 circ_0046264/miR-510/OPCML 在皮肤鳞状细胞癌发生发展过程中的作用机制尚未可知。因此,本研究主要探讨松果菊苷是否可通过调控 circ_0046264/miR-510/OPCML 表达从而调节人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞增殖及凋亡过程。

1 材料

1.1 试剂

松果菊苷购自上海同田生物技术有限公司 (质量分数 $\geq 98\%$, 货号 82854-37-3); 人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞购自上海研生实业有限公司; DMEM 培养液与胎牛血清购自美国 Gibco 公司; Trizol 试剂、cDNA 合成试剂、qRT-PCR 试剂购自北京天根生化; Lipofectamine™ 3000 转染试剂购自美国 Thermo Fisher 公司。circ_0046264 过表达载体 (pcDNA-circ_0046264) 及其对照空载体 (pcDNA) 购自美国 Invitrogen 公司; miR-510 寡核苷酸抑制物 (miR-510 inhibitor) 及其阴性对照 (anti-miR-NC)、miR-510 寡核苷酸模拟物 (miR-510

mimic) 及阴性对照 mimic-NC 序列 (miR-NC)、circ_0046264 小分子干扰 RNA (si-circ_0046264) 购自上海吉玛制药; MTT 试剂、凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝; 野生型载体 WT-circ_0046264、WT-OPCML 与突变型载体 MUT-circ_0046264、MUT-OPCML 及荧光素酶活性检测试剂盒购自美国 Promega 公司; 兔抗人 OPCML 抗体购自美国 Abcam 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自武汉博士德生物。

1.2 仪器

37 °C 培养箱购自美国 Thermo 公司; CytoFLEX 流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司; Western blotting 系统购自美国 Bio-Rad 公司; StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司; CK40 荧光倒置显微镜与 CX23 光学显微镜购自日本 Olympus 公司。

2 方法

2.1 细胞培养与分组

应用含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 °C 培养箱内培养, 待 A431 细胞生长融合度达到 80% 时进行消化、传代, 将 A431 细胞按照每孔 1×10^4 个接种于 6 孔板, 用含有不同质量浓度 (12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/L}$) 松果菊苷的培养基处理 24 h^[8]。同时将正常培养的 A431 细胞记为对照组。参照 Lipofectamine™ 3000 转染试剂说明书将 pcDNA、pcDNA-circ_0046264、anti-miR-NC、miR-510 inhibitor 分别转染至 A431 细胞, 分别记为 pcDNA 组、pcDNA-circ_0046264 组、anti-miR-NC 组、miR-510 inhibitor 组。将 si-circ_0046264、miR-510 mimic 分别转染至 A431 细胞, 转染成功后加入含有质量浓度为 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 松果菊苷的培养基处理 24 h, 分别记为松果菊苷 + si-circ_0046264 组、松果菊苷 + miR-510 mimic 组。

2.2 MTT 检测细胞增殖

收集各组 A431 细胞接种于 96 孔板 (3×10^3 个/孔), 每孔加入 MTT 溶液 20 μL , 于培养箱继续培养 4 h 后弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 避光振荡孵育 5 min, 应用酶标仪检测各孔吸光度值 (A), 并计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率 = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$

2.3 平板克隆形成实验

收集各组 A431 细胞接种于 6 孔板(1 000 个/孔), 于培养箱内继续培养 14 d, 用 4%多聚甲醛固定 20 min, 0.4%结晶紫染色液染色 15 min, 于显微镜下观察并统计细胞集落形成数(细胞数高于 50 个即为 1 个集落)。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

用胰蛋白酶消化各组 A431 细胞, 加入培养基终止消化, 1 000 r/min 转速离心 6 min, 然后用预冷 PBS 洗涤细胞沉淀, 加入 500 μL 结合缓冲液, 分别加入 5 μL Annexin V-FITC 与 5 μL PI, 振荡摇晃孵育 10 min, 应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.5 qRT-PCR 检测 circ_0046264、miR-510 的表达水平

RNA 提取试剂盒提取各组 A431 细胞总 RNA, 反转录体系: 5 $\times$ gDNA Buffer 2 μL , 10 $\times$ King RT Buffer 2 μL , FastKing RT Enzyme Mix 1 μL , FQ-RT Primer Mix 2 μL , RNA (2 μg), RNase-Free ddH₂O 补足体系至 20 μL ; 反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min。取 cDNA 2 μL 进行 qRT-PCR 反应, 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 36 次循环。应用荧光定量 PCR 仪检测 circ_0046264、miR-510 相对表达量。

每组待检目的基因 C_t 均值减去内参基因 C_t 均值得到 ΔC_t , 再用实验组的每个 ΔC_t 减去对照组的 ΔC_t 均值得到 $\Delta\Delta C_t$, circ_0046264、miR-510 相对表达量计算, 也就是相对于对照组即 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

2.6 双荧光素酶报告实验检测 circ_0046264 与 miR-510 及 miR-510 与 OPCML 的靶向关系

Circular RNA Interactome 数据库预测显示, circ_0046264 与 miR-510 存在结合位点, Targetscan 数据库预测显示, miR-510 与 OPCML 存在结合位点,

参照 Lipofectamine™ 3000 试剂说明书将 miR-NC/WT-circ_0046264、miR-NC/MUT-circ_0046264、miR-NC/WT-OPCML、miR-NC/MUT-OPCML、miR-510 mimic/WT-circ_0046264、miR-510 mimic/MUT-circ_0046264、miR-510 mimic/WT-OPCML、miR-510 mimic/MUT-OPCML 分别共转染至 A431 细胞, 于培养箱内培养 48 h 后收集细胞并检测细胞相对荧光素酶活性。

2.7 Western blotting 检测 OPCML 蛋白表达量

胰蛋白酶消化、收集与裂解各组 A431 细胞, 提取总蛋白后制备 SDS-PAGE 凝胶, 50 μg 蛋白上样恒压 100 V 电泳, PVDF 膜 200 mA 转膜, 5%脱脂牛奶封闭 80 min, 一抗 OPCML (1:1 000) 与内参 GAPDH 抗体(1:2 000)稀释液 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h, 用二抗稀释液 (1:5 000) 在室温下孵育 80 min, ECL 显影, 应用 Image J 软件分析各条带灰度值。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 且均符合正态分布, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 松果菊苷对 A431 细胞增殖、凋亡的影响

与对照组比较, 松果菊苷 12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/L}$ 组细胞增殖抑制率和凋亡率升高 ($P < 0.05$), 集落形成数减少 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性, 见图 1 和表 1。

3.2 松果菊苷对 A431 细胞 circ_0046264、miR-510、OPCML 表达的影响

与对照组比较, 松果菊苷 12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/L}$ 组 circ_0046264、OPCML 的表达量显著升高, miR-510 的表达量降低 ($P < 0.05$), 且不同剂量组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2 和表 2。

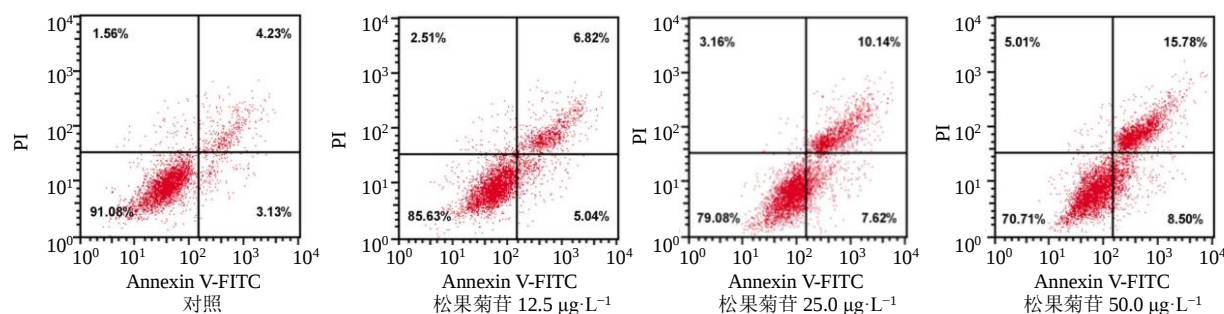
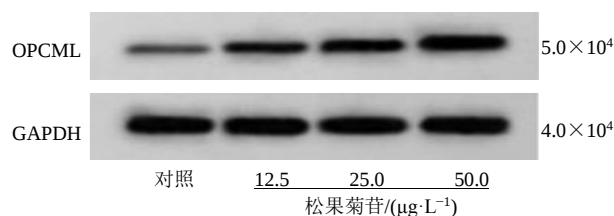


图 1 松果菊苷诱导 A431 细胞凋亡流式图

Fig. 1 Flow cytometry of A431 cell apoptosis induced by echinoside

表 1 松果菊苷对 A431 细胞增殖、凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 1 Effects of echinoside on proliferation and apoptosis of A431 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	抑制率/%	集落形成数/个	凋亡率/%
对照	—	0.00 ± 0.00	129.67 ± 3.30	7.36 ± 0.36
松果菊苷	12.5	15.68 ± 0.87*	104.00 ± 2.16*	11.86 ± 0.52*
	25.0	37.60 ± 1.35**	84.33 ± 1.70**	17.76 ± 0.84**
	50.0	46.73 ± 1.92** [▲]	62.00 ± 0.82** [▲]	24.28 ± 0.81** [▲]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与松果菊苷 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: ** $P < 0.05$; 与松果菊苷 25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [▲] $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; ** $P < 0.05$ vs echinoside 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ group; [▲] $P < 0.05$ vs echinoside 25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ group图 2 松果菊苷对 A431 细胞中 OPCML 蛋白表达的影响 ($n = 3$)Fig. 2 Effect of echinoside on OPCML protein expression in A431 cells ($n = 3$)

3.3 过表达 circ_0046264 对 A431 细胞增殖、凋亡的影响

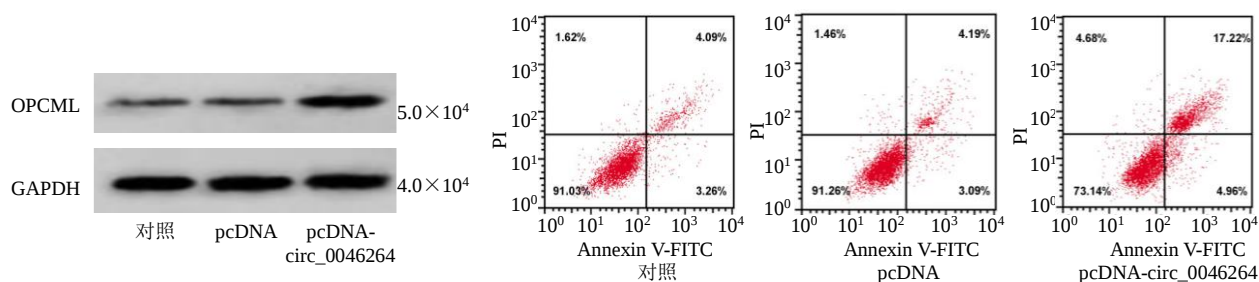
与对照组、pcDNA 组比较, pcDNA-circ_0046264 组 miR-510 的表达量降低, OPCML 蛋白水平升高 ($P < 0.05$), 细胞增殖抑制率和凋亡率升高, 集落形成数减少 ($P < 0.05$), 见图 3 和表 3。

3.4 抑制 miR-510 对 A431 细胞增殖、凋亡的影响

与对照组、anti-miR-NC 组比较, miR-510 inhibitor

表 2 松果菊苷对 circ_0046264、miR-510、OPCML 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 2 Effects of echinoside on the relative expression levels of circ_0046264, miR-510 and OPCML ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	相对表达量		
		circ_0046264	miR-510	OPCML 蛋白
对照	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.15 ± 0.01
松果菊苷	12.5	1.49 ± 0.07*	0.72 ± 0.04*	0.29 ± 0.03*
	25.0	2.38 ± 0.06**	0.47 ± 0.03**	0.47 ± 0.04**
	50.0	3.77 ± 0.07** [▲]	0.21 ± 0.01** [▲]	0.70 ± 0.05** [▲]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与松果菊苷 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: ** $P < 0.05$; 与松果菊苷 25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: [▲] $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; ** $P < 0.05$ vs echinoside 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ group; [▲] $P < 0.05$ vs echinoside 25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ group图 3 过表达 circ_0046264 对 A431 细胞凋亡和 OPCML 蛋白表达的影响 ($n = 3$)Fig. 3 Effects of circ_0046264 overexpression on apoptosis and OPCML protein expression of A431 cells ($n = 3$)表 3 过表达 circ_0046264 对 A431 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 3 Effects of circ_0046264 overexpression on A431 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	相对表达量			抑制率/%	集落形成数/个	凋亡率/%
	circ_0046264	miR-510	OPCML 蛋白			
对照	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.00 ± 0.00	128.00 ± 4.08	7.35 ± 0.41
pcDNA	0.99 ± 0.02	0.99 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.01 ± 0.01	128.67 ± 4.78	7.28 ± 0.69
pcDNA-circ_0046264	3.19 ± 0.08* ^{&}	0.34 ± 0.02* ^{&}	0.61 ± 0.04* ^{&}	43.01 ± 2.70* ^{&}	73.00 ± 1.63* ^{&}	22.18 ± 0.99* ^{&}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 pcDNA 组比较: [&] $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; [&] $P < 0.05$ vs pcDNA group

组 OPCML 蛋白表达、细胞增殖抑制率和凋亡率均显著升高, 集落形成数显著减少 ($P < 0.05$), 见图 4 和表 4。

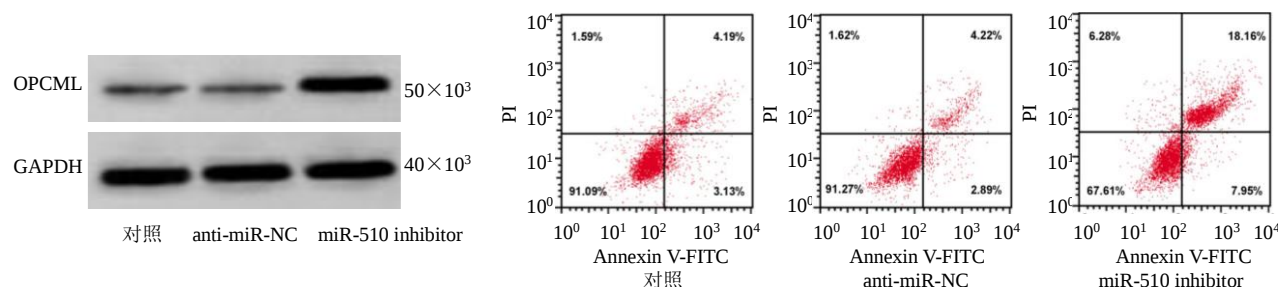


图 4 抑制 miR-510 对 A431 细胞凋亡和 OPCML 蛋白表达的影响 ($n = 3$)

Fig. 4 Effect of inhibiting miR-510 on apoptosis and OPCML protein expression of A431 cells ($n = 3$)

表 4 抑制 miR-510 对 A431 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of inhibition of miR-510 on A431 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对表达量		抑制率/%	集落形成数/个	凋亡率/%
	miR-510	OPCML 蛋白			
对照	1.00 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.00 ± 0.00	129.67 ± 4.99	7.32 ± 0.28
anti-miR-NC	1.01 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.02 ± 0.02	127.33 ± 4.64	7.11 ± 0.20
miR-510 inhibitor	0.12 ± 0.01* [@]	0.82 ± 0.05* [@]	48.01 ± 1.77* [@]	51.00 ± 0.82* [@]	26.11 ± 0.93* [@]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 anti-miR-NC 组比较: @ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; @ $P < 0.05$ vs anti-miR-NC group

数据库预测显示, miR-510 与 OPCML 存在互补序列, 见图 5。共转染野生型载体 WT-circ_0046264 的细胞实验中, 与 miR-NC 组比较, miR-510 组 A431 细胞相对荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$); 共转染野生型载体 WT-OPCML 的细胞实验中, 与 miR-NC 组比较, miR-510 组 A431 细胞相对荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$), 见表 5, 表明 circ_0046264 可靶向结合 miR-510, miR-510 可靶向结合 OPCML。

名称	序列
WT-circ_0046264	5' UGCAAGGCUCUGGCCCCUGAGUA 3'
miR-510	3' CACUAACGGUGAGAGGACUCAU 5'
MUT-circ_0046264	5' UGCAAGGCUCUGGCCAAGCCAGCA 3'
WT-OPCML	5' UGAAGAGUCCACCCGCCUGAGUG 3'
miR-510	3' CACUAACGGUGAGAGGACUCAU 5'
MUT-OPCML	5' UGAAGAGUCCACCCGCAAGCGG 3'

图 5 circ_0046264、miR-510 的互补序列和 miR-510、OPCML 的互补序列

Fig. 5 Complementary sequences of circ_0046264 and miR-510, and sequences of miR-510 and OPCML

表 5 双荧光素酶报告实验结果

Table 5 Experimental results of dual-luciferase report

组别	WT-circ_0046264	MUT-circ_0046264	WT-OPCML	MUT-OPCML
miR-NC	1.00 ± 0.09	0.99 ± 0.08	1.01 ± 0.08	0.99 ± 0.07
miR-510	0.36 ± 0.03*	0.96 ± 0.07	0.15 ± 0.01*	1.02 ± 0.09

与 miR-NC 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs miR-NC group

3.6 抑制 circ_0046264 或过表达 miR-510 对松果菊苷处理的 A431 细胞增殖、凋亡的影响

与松果菊苷组比较, 松果菊苷 + si-circ_0046264 组、松果菊苷 + miR-510 mimic 组 miR-510 的表达量升高 ($P < 0.05$), OPCML 蛋白表达显著降低, 细胞增殖抑制率和凋亡率显著降低

($P < 0.05$), 集落形成数增多 ($P < 0.05$), 见图 6 和表 6。

4 讨论

circRNA 是一类不具有 5' 端帽子结构与 3' 端多聚腺苷酸尾巴结构的非编码 RNA 分子, 其可通过吸附 miRNA 而调控其靶基因表达, 并可通过吸附

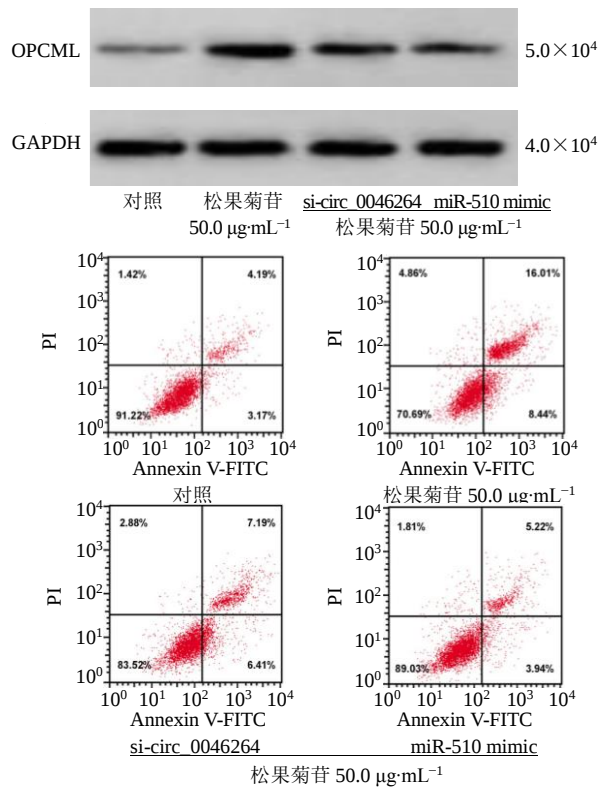


图 6 抑制 circ_0046264 或过表达 miR-510 对松果菊苷处理的 A431 细胞凋亡和 OPCML 蛋白表达的影响 ($n=3$)

Fig. 6 Effects of circ_0046264 inhibition or overexpression of miR-510 on apoptosis and OPCML protein expression of A431 cells treated with echinoside ($n=3$)

表 6 抑制 circ_0046264 或过表达 miR-510 对松果菊苷处理的 A431 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effects of circ_0046264 inhibition or overexpression of miR-510 on echinoside treated A431 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	相对表达量			抑制率/%	集落形成数/个	凋亡率/%
	circ_0046264	miR-510	OPCML			
对照	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	0.13 $\pm$ 0.01	0.00 $\pm$ 0.00	130.00 $\pm$ 4.32	7.36 $\pm$ 0.43
松果菊苷	3.74 $\pm$ 0.09*	0.21 $\pm$ 0.01*	0.70 $\pm$ 0.05*	47.54 $\pm$ 2.27*	61.67 $\pm$ 1.25*	24.45 $\pm$ 0.87*
松果菊苷+si-circ_0046264	1.65 $\pm$ 0.06#	0.67 $\pm$ 0.04#	0.33 $\pm$ 0.03#	22.20 $\pm$ 1.14#	98.00 $\pm$ 3.56#	13.60 $\pm$ 0.68#
松果菊苷+miR-510 mimic	1.21 $\pm$ 0.04#	0.88 $\pm$ 0.03#	0.19 $\pm$ 0.01#	10.85 $\pm$ 0.51#	117.00 $\pm$ 2.94#	9.16 $\pm$ 0.36#

与对照组比较: * $P<0.05$; 与松果菊苷组比较: # $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs echinoside group

量与患者临床病理分期密切相关,上调其表达可抑制肺癌细胞增殖及转移^[15-16]。但 circ_0046264 在皮肤鳞状细胞癌中的表达及其可能作用机制尚未可知。本研究结果显示, circ_0046264 过表达可抑制皮肤鳞状细胞癌细胞增殖及促进细胞凋亡,其作用机制可能与抑制 miR-510 表达及促进 OPCML 表达有关。本研究证实, circ_0046264 可靶向调节 miR-510 的表达, miR-510 可靶向调节 OPCML 的表达,提示 circ_0046264/miR-510/OPCML 在皮肤

miRNA 而抑制其表达,从而参与细胞增殖、凋亡等生物学过程。研究表明 circRNA 在皮肤鳞状细胞癌中表达异常,并可通过调节 miRNA/mRNA 表达参与皮肤鳞状细胞癌发生及发展过程,还可能作为皮肤鳞状细胞癌分子治疗的潜在靶点^[9-11]。但 circRNA 是否可作为药物治疗皮肤鳞状细胞癌的潜在靶点尚需进一步探究。

松果菊苷可能通过抑制 SOX4/Wnt/ β -catenin 信号通路的活化从而抑制急性髓系白血病细胞增殖^[12],可通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化而抑制乳腺癌细胞生长^[13],可抑制肝细胞癌移植瘤生长^[14]。但松果菊苷对皮肤鳞状细胞癌细胞增殖及凋亡的影响尚未可知。本研究结果显示,松果菊苷能够以浓度依赖性方式增高细胞增殖抑制率和凋亡率,而集落形成数减少,提示松果菊苷可通过抑制皮肤鳞状细胞癌细胞增殖及促进细胞凋亡从而发挥抗皮肤鳞状细胞癌作用。为进一步探究松果菊苷治疗皮肤鳞状细胞癌的潜在作用机制,本研究结果显示,随着松果菊苷作用浓度的升高,皮肤鳞状细胞癌细胞中 circ_0046264、OPCML 的表达量升高,而 miR-510 的表达量降低,提示松果菊苷可能通过上调 circ_0046264、OPCML 表达及下调 miR-510 表达从而调节皮肤鳞状细胞癌细胞增殖及凋亡。

circ_0046264 在肺癌细胞中呈低表达,其表达

鳞状细胞癌发生发展过程中可发挥重要调控作用。miR-510-5p 通过抑制 SNHG15 促进甲状腺癌细胞增殖、迁移及侵袭^[17]。miR-510 高表达可促进非小细胞肺癌细胞增殖及转移^[18]。OPCML 属于免疫球蛋白超家族成员,其可通过激活相关信号通路而发挥抑癌基因作用^[19-20]。本研究结果显示,抑制 miR-510 表达可促进 OPCML 表达从而抑制皮肤鳞状细胞癌细胞增殖及促进细胞凋亡,而上调其表达或抑制 circ_0046264 表达均可通过抑制 OPCML 表

达而降低松果菊苷对皮肤鳞状细胞癌细胞增殖及凋亡的作用,提示松果菊苷可通过调节 circ_0046264/miR-510/OPCML 表达而抑制皮肤鳞状细胞癌发展进程。

综上所述,松果菊苷可抑制皮肤鳞状细胞癌细胞增殖及促进细胞凋亡,其作用机制与促进 circ_0046264、OPCML 表达及抑制 miR-510 的表达有关,其中 circ_0046264 与 miR-510 存在靶向调控关系,miR-510 与 OPCML 存在靶向调控关系,可为进一步揭示松果菊苷抗皮肤鳞状细胞癌的分子机制奠定实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 邢天娇,李东霞.皮肤鳞状细胞癌的发病机制及治疗进展[J].医学综述,2020,26(19):3837-3842.
- [2] 王鑫,范志霞,王朋敏等.皮肤鳞状细胞癌的研究进展[J].中国临床研究,2018,31(6):850-852.
- [3] 石磊,赵天恩.皮肤基底细胞癌和鳞状细胞癌的研究现状[J].国外医学:皮肤性病学分册,2002(5):313-316.
- [4] 汤呈怀.松果菊苷通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路发挥抗乳腺癌效应的作用机制研究[D].重庆:重庆医科大学,2020.
- [5] Jin J, Yao Z, Qin H, et al. Bufalin inhibits the malignant development of non-small cell lung cancer by mediating the circ_0046264/miR-522-3p axis [J]. *Biotechnol Lett*, 2021, 43(6): 1229-1240.
- [6] Guo Q J, Mills J N, Bandurraga S G, et al. MicroRNA-510 promotes cell and tumor growth by targeting peroxiredoxin1 in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(4): 70-80.
- [7] Fang X, Dong Y, Yang R, et al. LINC00619 restricts gastric cancer progression by preventing microRNA-224-5p-mediated inhibition of OPCML [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 689: 108390.
- [8] 韩一梅,靳伟民,曾会,等.松果菊苷对结肠癌 SW480 细胞体内外增殖、侵袭和转移的影响[J].广州中医药大学学报,2020,37(8):1542-1549.
- [9] Lu X, Gan Q, Gan C. Circular RNA circSEC24A promotes cutaneous squamous cell carcinoma progression by regulating miR-1193/MAP3K9 axis [J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 653-666.
- [10] Gao L, Jin H J, Zhang D, et al. Silencing circRNA_001937 may inhibit cutaneous squamous cell carcinoma proliferation and induce apoptosis by preventing the sponging of the miRNA-597-3p/FOSL2 pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(5): 1653-1660.
- [11] Zhang D W, Wu H Y, Zhu C R, et al. CircRNA hsa_circ_0070934 functions as a competitive endogenous RNA to regulate HOXB7 expression by sponging miR-1236-3p in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2020, 57(2): 478-487.
- [12] 冯磊,马秋玲,石琳,等.松果菊苷通过抑制 SOX4/Wnt/ β -Catenin 信号抑制急性髓系白血病细胞增殖[J].免疫学杂志,2020,36(2):138-142.
- [13] Tang C, Gong L, Xu L, et al. Echinacoside inhibits breast cancer cells by suppressing the Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(1): 170-175.
- [14] Ye Y, Song Y, Zhuang J, et al. Anticancer effects of echinacoside in hepatocellular carcinoma mouse model and HepG₂ cells [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1880-1888.
- [15] Yang L, Wang J, Fan Y, et al. Hsa_circ_0046264 up-regulated BRCA2 to suppress lung cancer through targeting hsa-miR-1245 [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 115.
- [16] Liu Z H, Yang S Z, Chen X T, et al. Correlations of hsa_circ_0046264 expression with onset, pathological stage and chemotherapy resistance of lung cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(18): 9511-9521.
- [17] Liu Y, Li J, Li M, et al. microRNA-510-5p promotes thyroid cancer cell proliferation, migration, and invasion through suppressing SNHG15 [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 20(1): 1-10.
- [18] Wu W, He L, Huang Y, et al. MicroRNA-510 plays oncogenic roles in non-Small cell lung cancer by directly targeting SRC kinase signaling inhibitor 1 [J]. *Oncol Res*, 2019, 27(8): 879-887.
- [19] 董欣敏,郑婕,张子英,等.木犀草素通过逆转 OPCML 基因甲基化抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖[J].南方医科大学学报,2020,40(4):550-555.
- [20] 王群,袁杰,黄军,等.上调 LncRNA RP11-173C1.1 对甲状腺癌 B-CPAP 细胞增殖和侵袭能力的影响[J].肿瘤防治研究,2020,47(3):170-174.

[责任编辑 高源]