

黄芩苷联合奥沙利铂调控 miR-433-3p/SRC 对胃癌细胞增殖和侵袭的影响

周 菲, 庄敏之*, 吴 瑛

上海市第四人民医院 中医科, 上海 200434

摘要: 目的 探究黄芩苷联合奥沙利铂调控 miR-433-3p/SRC 对胃癌细胞增殖和侵袭的影响。方法 将 SGC-7901 细胞分为对照组、黄芩苷 (100、200、300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、奥沙利铂 (33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, 联合用药 (300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩苷 + 33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 奥沙利铂) 组, miR-433-3p 组、miR-NC 组、anti-miR-433-3p 组、anti-miR-NC 组、pcDNA-SRC 组、si-SRC 组, miR-433-3p + 联合用药组、anti-miR-433-3p + 联合用药组、pcDNA-SRC + 联合用药组、si-SRC + 联合用药组、miR-433-3p + pcDNA-SRC + 联合用药组。CCK-8 检测细胞增殖能力; Transwell 小室法检测细胞侵袭能力; 流式细胞仪检测细胞凋亡率; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测细胞中 miR-433-3p 表达; 双荧光素酶报告检测 miR-433-3p 和 SRC 的靶向关系; Western blotting 检测细胞中 SRC 蛋白表达。结果 与对照组相比, 黄芩苷 (100、200、300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、奥沙利铂组、联合用药组细胞增殖抑制率、凋亡率和 miR-433-3p 表达显著增加 ($P < 0.05$), 细胞侵袭数目、SRC 蛋白表达显著减少 ($P < 0.05$); 与黄芩苷 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、奥沙利铂组相比, 联合用药组细胞增殖抑制率、凋亡率显著增加, 细胞侵袭数目显著减少; 与黄芩苷 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, miR-433-3p 表达显著增加 ($P < 0.05$); 与奥沙利铂组比较, SRC 蛋白表达显著减少 ($P < 0.05$)。与对照组比较, miR-433-3p 组细胞中 miR-433-3p 表达显著升高, SRC 蛋白表达显著降低, anti-miR-433-3p 组细胞中 miR-433-3p 表达显著降低, SRC 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); miR-433-3p + 联合用药组细胞增殖抑制率和凋亡率显著高于联合用药组, 细胞侵袭数目显著少于联合用药组 ($P < 0.05$), anti-miR-433-3p + 联合用药组细胞增殖抑制率和凋亡率显著低于联合用药组, 细胞侵袭数目显著多于联合用药组 ($P < 0.05$)。miR-433-3p 组 SRC-WT 荧光素酶活性显著低于 miR-NC 组 ($P < 0.05$)。si-SRC 组细胞中 SRC 蛋白表达显著低于对照组 ($P < 0.05$), pcDNA-SRC 组细胞中 SRC 蛋白表达显著高于对照组 ($P < 0.05$); 与 pcDNA-SRC 组相比, miR-433-3p + pcDNA-SRC 组细胞中 SRC 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。si-SRC + 联合用药组细胞增殖抑制率和凋亡率显著高于联合用药组, 细胞侵袭数目显著少于联合用药组 ($P < 0.05$), pcDNA-SRC + 联合用药组细胞增殖抑制率和凋亡率显著低于联合用药组, 细胞侵袭数目显著高于联合用药组 ($P < 0.05$)。与 pcDNA-SRC + 联合用药组相比, miR-433-3p + pcDNA-SRC + 联合用药组细胞增殖抑制率和凋亡率显著降低 ($P < 0.05$), 细胞侵袭数目显著升高 ($P < 0.05$)。结论 黄芩苷联合奥沙利铂可通过 miR-433-3p 靶向调控 SRC 抑制胃癌细胞的增殖和侵袭, 诱导胃癌细胞凋亡。

关键词: 黄芩苷; 奥沙利铂; miR-433-3p/SRC; 胃癌; 增殖; 侵袭

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 03-0529-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.03.010

Mechanism of regulation of miR-433-3p/SRC by baicalin combined with oxaliplatin on proliferation and invasion of gastric cancer cells

ZHOU Fei, ZHUANG Minzhi, WU Ying

Department of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Fourth People's Hospital, Shanghai 200434, China

Abstract: Objective To investigate the effect of baicalin combined with oxaliplatin to regulate miR-433-3p/SRC on the proliferation and invasion of gastric cancer cells. **Methods** SGC-7901 cells were divided into control group, baicalin (100, 200, and 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, oxaliplatin group (33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and combination therapy group (300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ baicalin and 33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ oxaliplatin). They were divided into miR-433-3p group, miR-NC group, anti-miR-433-3p group, anti-miR-NC group, pcDNA-SRC group, si-SRC group, miR-433-3p + combination therapy group, anti-miR-433-3p + combination therapy group, pcDNA-SRC + combination

收稿日期: 2023-04-20

基金项目: 上海市虹口区卫生健康委员会中医药科研课题(HKQ-ZYY-2020-21)

第一作者: 周 菲(1978—), 汉族, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为中医药治疗肿瘤。E-mail: g0213gh@163.com

*通信作者: 庄敏之(1971—), 汉族, 本科, 副主任医师, 研究方向为中医科、中医药治疗心血管疾病。E-mail: g0213gh@163.com

therapy group, si-SRC + combination therapy group, and miR-433-3p + pcDNA-SRC + combination therapy group. CCK-8 method was used to detect cell proliferation ability, transwell assay was used to detect cell invasion ability, detection of cell apoptosis rate using flow cytometry, real time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-433-3p in cells, double luciferase assay was used to detect the targeting relationship between miR-433-3p and SRC, and Western blotting was used to detect the expression of SRC protein in cells. **Results** Compared with control group, the cell proliferation inhibition rate, apoptosis rate and miR-433-3p expression increased and the cell invasion number and SRC protein expression decreased in baicalin (100, 200, and 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), oxaliplatin and combination therapy groups ($P < 0.05$). Compared with the oxaliplatin group and baicalin 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group, the combination therapy group showed a significant increase in cell proliferation inhibition rate and apoptosis rate, while the number of cell invasions decreased significantly. Compared with baicalin 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group, the expression of miR-433-3p significantly increased in combination therapy group ($P < 0.05$). Compared with the oxaliplatin group, the expression of SRC protein was significantly reduced in combination therapy group ($P < 0.05$). Compared with control group, miR-433-3p expression was elevated and SRC protein expression was decreased in cells of miR-433-3p group, and miR-433-3p expression was decreased and SRC protein expression was increased in cells of anti-miR-433-3p group ($P < 0.05$). The cell proliferation inhibition rate and apoptosis rate of the miR-433-3p + combination therapy group were significantly higher than those of the combination therapy group, and the number of cell invasions was significantly lower than that of the combination therapy group ($P < 0.05$). The cell proliferation inhibition rate and apoptosis rate of the anti miR-433-3p+combination therapy group were significantly lower than those of the combination therapy group, and the number of cell invasions was significantly higher than that of the combination therapy group ($P < 0.05$). The luciferase activity of SRC-WT in the miR-433-3p group was significantly lower than that in the miR-NC group ($P < 0.05$). The expression of SRC protein in si-SRC group cells was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$), while the expression of SRC protein in pcDNA-SRC group cells was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). Compared with the pcDNA-SRC group, the expression of SRC protein in the miR-433-3p+pcDNA-SRC group cells was significantly reduced ($P < 0.05$). The cell proliferation inhibition rate and apoptosis rate of the si-SRC+ combination therapy group were significantly higher than those of the combination therapy group, and the number of cell invasions was significantly lower than that of the combination therapy group ($P < 0.05$). The cell proliferation inhibition rate and apoptosis rate of the pcDNA-SRC+combination therapy group were significantly lower than those of the combination therapy group, and the number of cell invasions was significantly higher than that of the combination therapy group ($P < 0.05$). Compared with the pcDNA-SRC+combination group, the miR-433-3p+pcDNA-SRC+combination group showed a significant decrease in cell proliferation inhibition rate and apoptosis rate ($P < 0.05$), and a significant increase in cell invasion number ($P < 0.05$). **Conclusion** Baicalin combined with oxaliplatin can inhibit the proliferation and invasion of gastric cancer cells through miR-433-3p-targeted regulation of SRC and induce apoptosis of gastric cancer cells.

Key words: baicalin; oxaliplatin; miR-433-3p/SRC; gastric cancer; proliferation; invasion

胃癌是我国第2大常见肿瘤,也是导致患者死亡的第3大常见恶性肿瘤,我国胃癌的发病率和死亡率约占全球的一半^[1-2]。胃癌早期发病没有明显症状,多数患者在确诊时已为中晚期,往往错过了最佳的治疗时机。近年来,虽然胃癌患者生存率随着诊断和治疗术的提高而有所改善,但胃癌细胞的转移和复发导致患者5年内生存率仍较低^[3]。大量研究表明^[4],微小RNA(miRNA)可通过调控细胞增殖、侵袭等多种生物学活性介导肿瘤细胞发展发展。miR-433-3p是位于人体14号染色体上抑癌基因之一,研究发现其可通过靶向生长因子受体结合蛋白2抑制食管鳞癌细胞增殖和侵袭^[5];miR-433-3p可对宫颈癌细胞增殖和迁移发挥抑制作用^[6],因此猜测miR-433-3p可能作为抑癌基因介导胃癌细胞活性。病毒癌(SRC)基因是第一个被发现的有内在

酪氨酸激酶活性的癌基因,其蛋白可作为非受体酪氨酸激酶介导生长因子、黏附因子、趋化因子等多条下游信号通路,进而调控细胞的多种生物学活性,包括生长和黏附等^[7]。研究发现^[8],过度激活的SRC酪氨酸激酶时,会通过酪氨酸磷酸化异常影响多种肿瘤细胞的进程。但SRC能否作为miR-433-3p的靶基因调控胃癌细胞活性尚未见报道。黄芩苷是从黄芩中提取的黄酮类化合物之一,具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等多种药理学作用^[9-11],目前有研究证实,黄芩苷可抑制机体内多种肿瘤的生长,被临床广泛关注^[12]。奥沙利铂是第3代铂类化合物,是近年来临床治疗消化道系统肿瘤的常用药物之一^[13]。本研究联合黄芩苷和奥沙利铂干预胃癌细胞,探究其能否有协同作用,是否通过调控miR-433-3p/SRC影响胃癌细胞增殖和侵袭。

1 材料

1.1 细胞

人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 和胃癌细胞系 SGC-7901 (中国科学院细胞库)。

1.2 药物及主要试剂

黄芩苷 (质量分数 $\geq 98\%$, 购自中国药品生物制品检定所, 批号 27740-01-8); 奥沙利铂 (质量分数 $\geq 99.0\%$, 批号 100584-201303, 哈尔滨三联药业股份有限公司); miR-433-3p 模拟物 (miR-433-3p mimics) 及其阴性对照 (miR-NC)、干扰 miR-433-3p (anti-miR-433-3p) 及其阴性对照 (anti-miR-NC)、SRC 过表达 (pcDNA-SRC)、SRC 小干扰 RNA (si-SRC) (广州锐博生物科技有限公司); SRC 抗体 (美国 CST 公司); DMEM 培养基、MTT 试剂盒 (美国 Gibco 公司)。

1.3 主要仪器

Elx800 酶标仪 (美国伯乐公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); CX23 光学显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); 7700 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪 (美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

将人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 和胃癌细胞系 SGC-7901 接种于培养瓶中, 加入含 10% 胎牛血清、100 U $\cdot$ mL⁻¹青霉素和 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹链霉素的完全培养基, 将培养瓶置于常规培养箱, 设置条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。传代换液, 48 h 1 次, 取处于对数期的细胞进行后续实验。

2.2 细胞分组和转染

取对数生长的 SGC-7901 细胞, 调整细胞密度为每孔 3×10^3 个后接种于 96 孔板, 常规培养箱培养。后将 SGC-7901 细胞分别培养于含 100、200、300 μ mol $\cdot$ L⁻¹黄芩苷的培养基中, 奥沙利铂组培养于含 33 μ mol $\cdot$ L⁻¹奥沙利铂培养基中, 联合用药组培养于含 300 μ mol $\cdot$ L⁻¹黄芩苷和 33 μ mol $\cdot$ L⁻¹奥沙利铂培养基中, 用无血清培养基培养 SGC-7901 细胞记为对照组。

取对数生长的 SGC-7901 细胞, 根据转染试剂盒说明书, 分别将 Lipofectamine™ 200 转染试剂与 miR-433-3p mimics、miR-NC mimics、anti-miR-433-3p、anti-miR-NC、pcDNA-SRC、si-SRC 转染物进行转染, 设为 miR-433-3p 组、miR-NC 组、anti-miR-433-3p 组、anti-miR-NC 组、pcDNA-SRC 组、si-SRC 组, 未转染任何质粒的 SGC-7901 细胞设为对照组, 同

时转染 pcDNA-SRC 和 miR-433-3p mimics 设为 miR-433-3p+pcDNA-SRC 组, 转染 48 h 后采用 qRT-PCR 检测 miR-433-3p mRNA 表达, 采用 Western blotting 法检测 SRC 蛋白表达验证转染效率。转染成功后, 将上述各组细胞均培养于含 300 μ mol $\cdot$ L⁻¹黄芩苷和 33 μ mol $\cdot$ L⁻¹奥沙利铂培养基中 24 h, 分别标记为 miR-433-3p+联合用药组、anti-miR-433-3p+联合用药组、pcDNA-SRC+联合用药组、si-SRC+联合用药组、miR-433-3p+pcDNA-SRC+联合用药组。

2.3 CCK-8 法检测细胞增殖能力

取培养结束后的“2.2”项各组 SGC-7901 细胞, 将 100 μ L 的 CCK-8 溶液加入到 96 孔板中, 培养 1.5 h; 将孔板置于酶标仪 450 nm 处, 检测细胞吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖抑制率。

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

2.4 Transwell 小室法检测细胞侵袭能力

取“2.2”项各组 SGC-7901 细胞, 胰蛋白酶裂解细胞为悬液, 在细胞中加入含有 0.1% 胎牛血清的完全培养基, 调整细胞密度为 1.5×10^4 mL⁻¹。Transwell 上室中平铺 Matrigel 胶, 后用紫外线照射 6 h 消毒; 将 200 μ L 细胞悬液加入到下室中, 共孵育 Transwell 小室 24 h。将上室中残留的基质胶擦掉, 固定小室于甲醛溶液 10 min, 将 0.1% 结晶紫加入到上室中, 染色 10 min, 清洗小室并置于显微镜下, 观察各组细胞的侵袭数。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

取“2.2”项各组 SGC-7901 细胞, 分别加入 1 $\times$ binding buffer、10 μ L Annexin V 和 20 μ L PI; 弃掉原有的培养基, 加入配制好的 Annexin V/PI 染色工作液, 于常规培养箱孵育孔板。在孔板中加入胰蛋白酶裂解, 离心裂解后的细胞悬液, 收集上清液, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

2.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测细胞中 miR-433-3p mRNA 表达

取“2.2”项各组 SGC-7901 细胞, 加入 Trizol 裂解液裂解, 提取裂解后细胞和组织中总 RNA, 提取步骤按照试剂盒说明书进行。逆转录总 RNA 为 cDNA, 操作步骤按照试剂盒说明书操作。miR-433-3p 上游引物: 5'-AGAAGTACGGTGAGCCTGTC-3', 下游引物: 5'-CGTCTCACTCTGTACCCAG-3'; U6 上游引物: 5'-CTCGCTTCGGCA CACA-3', 下游引物: 5'-TGGTGTCTGTGAGTCG-3'。将离心引物瞬时离心, 后将去离子水加入到引物中充分混

匀,制备成 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮存液,最终稀释为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将引物 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 10 s; 60°C 退火 30 s; 共计 35 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析表达量。

2.7 双荧光素酶报告系统实验

打开 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 软件,选择物种为大鼠,在“Predicted Conserved Targets”选项卡中输入 SRC 基因的 3'UTR 序列,设置参数 Species=Mouse, Prediction Type=Conserved, UTR length cutoff=none, 预测发现 SRC 的 3'UTR 端与 miR-433-3p 有碱基互补结合点。

后设计野生型序列 SRC 3'-UTR (WT-SRC) 和突变型序列 SRC 3'-UTR (MUT-SRC) 区质粒。SGC-7901 细胞以每孔 5×10^6 个接种于 6 孔板中,根据 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书,野生型/突变型 SRC 与 miR-NC 或 miR-433-3p 质粒共转染,后检测各组荧光素酶活性。

2.8 Western blotting 检测细胞中 SRC 蛋白表达

取各组 SGC-7901 细胞,胰蛋白酶裂解细胞为悬液,用 DAB 法检测总蛋白浓度。将蛋白溶液的终质量浓度配制为 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,将蛋白溶液置于热水中煮沸 10 min,后保存在 -20°C 冰箱中。将 $30 \mu\text{g}$ 的蛋

白样品用 200 V 电压电泳,转移蛋白样品于 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h,将一抗 SRC (1:1 000) 加入到 PVDF 膜上,孵育一抗在 4°C 环境中过夜;流水冲洗 PVDF 膜,将二抗 (1:1 000) 加入到 PVDF 膜上,室温孵育 2 h。ECL 发光液加入到细胞中,曝光显影后用 Image Lab 软件分析条带灰度值。

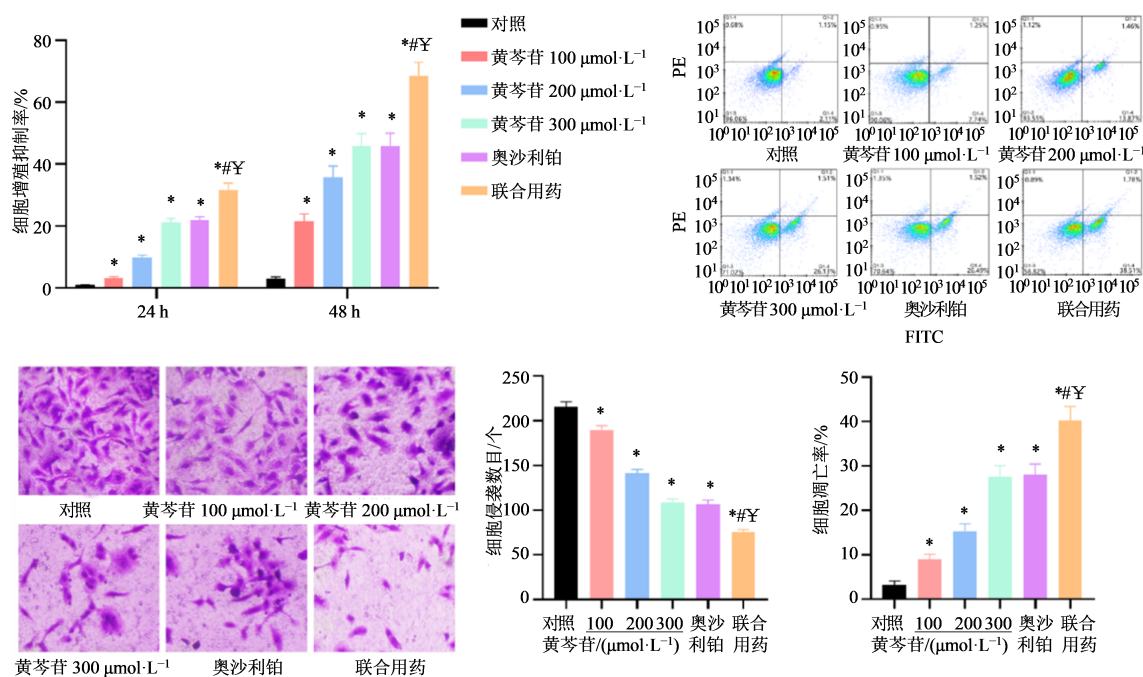
2.9 统计学分析

实验数据采用 Graphpad prism 8.0 软件进行统计学分析,计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同组间数据采用重复测量方差和单因素方差分析,各组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 黄芩苷联合奥沙利铂对 SGC-7901 细胞增殖、侵袭和凋亡能力的影响

如图 1 所示,与对照组比较,各给药组 SGC-7901 细胞增殖抑制率、凋亡率显著升高 ($P < 0.05$),细胞侵袭数目显著减少 ($P < 0.05$);黄芩苷 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞增殖抑制率、凋亡率、细胞侵袭数目与奥沙利铂组相比无统计学意义,联合用药组细胞增殖抑制率、凋亡率显著高于黄芩苷 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组、奥沙利铂组 ($P < 0.05$),细胞侵袭数目显著低于 2 个单独给药组 ($P < 0.05$)。



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与黄芩苷 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$; 与奥沙利铂组比较: ¥ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs baicalin $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group; ¥ $P < 0.05$ vs oxaliplatin group.

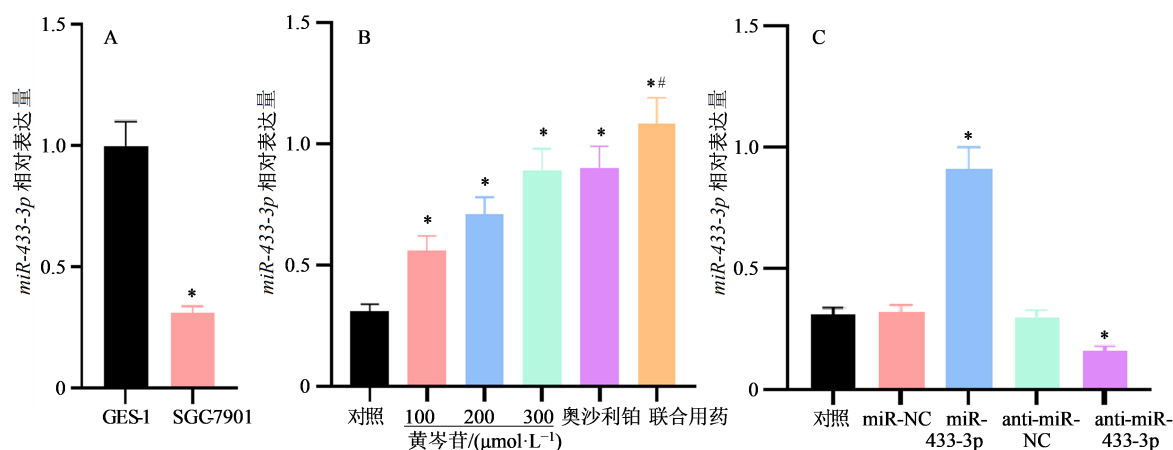
图1 黄芩苷联合奥沙利铂对SGC-7901细胞增殖、凋亡和侵袭的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effect of baicalin combined with oxaliplatin on proliferation, apoptosis ability and invasion of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.2 黄芩苷联合奥沙利铂对 *miR-433-3p* 表达的影响

与人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 相比,胃癌细胞 SGC-7901 中 *miR-433-3p* 表达显著降低 ($P < 0.05$) (图 2-A)。与对照组相比,各给药组细胞 *miR-433-3p* 表达均显著升高 ($P < 0.05$);黄芩苷 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和奥沙利铂组细胞中 *miR-433-3p* 表达相比无统计

学意义;联合用药组细胞中 *miR-433-3p* 表达明显高于黄芩苷 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、奥沙利铂组,与黄芩苷 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较差异显著 ($P < 0.05$) (图 2-B)。与对照组比较,*miR-433-3p* 组细胞中 *miR-433-3p* 表达显著升高,anti-*miR-433-3p* 组细胞中 *miR-433-3p* 表达显著降低 ($P < 0.05$),*miR-NC* 组、anti-*miR-NC* 组细胞中 *miR-433-3p* 表达无显著差异 (图 2-C)。



A-胃上皮细胞 GES-1 和胃癌细胞 SGC-7901 中 *miR-433-3p* 表达比较,与 GES-1 细胞组比较: $*P < 0.05$; B-黄芩苷联合奥沙利铂干预 SGC-79011 中 *miR-433-3p* 表达,与对照组比较: $*P < 0.05$,与黄芩苷 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: $^{*}P < 0.05$; C-*miR-433-3p*、anti-*miR-433-3p* 转染验证,与对照组比较: $*P < 0.05$ 。

A-comparison of *miR-433-3p* expression in gastric epithelial cell GES-1 and gastric cancer cell SGC-7901, $*P < 0.05$ vs GES-1 cell group; B-baicalin combined with oxaliplatin intervened in expression of *miR-433-3p* in SGC-79011, $*P < 0.05$ vs control group, $^{*}P < 0.05$ vs baicalin $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; C-*miR-433-3p* and anti *miR-433-3p* transfection validation, $*P < 0.05$ vs control group.

图2 *miR-433-3p* 在 GES-1 和 SGC-7901 细胞中表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Comparison of *miR-433-3p* expression in GES-1 and SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.3 *miR-433-3p* 对联合用药后 SGC-7901 增殖、侵袭和凋亡的影响

miR-433-3p + 联合用药组细胞增殖抑制率和凋亡率显著高于联合用药组、细胞侵袭数目显著低于联合用药组 ($P < 0.05$); anti-*miR-433-3p* + 联合用药组细胞增殖抑制率和凋亡率显著低于联合用药组、细胞侵袭数目显著高于联合用药组 ($P < 0.05$) (图 3)。

3.4 *miR-433-3p* 靶向调控 SRC 表达

如图 4 所示, SRC 的 3'UTR 端与 *miR-433-3p* 有碱基互补结合点。向细胞中转染 SRC-WT 时, *miR-433-3p* 组荧光素酶活性显著低于 *miR-NC* 组 ($P < 0.05$); 向细胞中转染 SRC-MUT 时, *miR-433-3p* 组与 *miR-NC* 组荧光素酶活性相比无明显差异。对照组、*miR-NC* 组和 anti-*miR-NC* 组细胞中 SRC 蛋白表达相比差异无统计学意义; 与对照组相比, *miR-433-3p* 组细胞中 SRC 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), anti-*miR-433-3p* 组细胞中 SRC 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$)。

3.5 黄芩苷联合奥沙利铂调控 *miR-433-3p*/SRC 轴调节 SGC-7901 细胞增殖、侵袭和凋亡

与胃上皮细胞 GES-1 相比,胃癌细胞 SGC-7901 中 SRC 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$); 与对照组相比,各给药组 SRC 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$); 联合用药组细胞中 SRC 蛋白表达显著低于奥沙利铂组 ($P < 0.05$)。结果见图 5。

si-SRC 组细胞中 SRC 蛋白表达低于对照组 ($P < 0.05$), pcDNA-SRC 组细胞中 SRC 蛋白表达高于对照组 ($P < 0.05$); 与 pcDNA-SRC 组相比, *miR-433-3p* + pcDNA-SRC 组细胞中 SRC 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。

如图 6 所示, si-SRC + 联合用药组细胞增殖抑制率和凋亡率显著高于联合用药组 ($P < 0.05$), 细胞侵袭数目显著低于联合用药组 ($P < 0.05$); pcDNA-SRC + 联合用药组细胞增殖抑制率和凋亡率显著低于联合用药组 ($P < 0.05$), 细胞侵袭数目显著高于联合用药组 ($P < 0.05$)。 *miR-433-3p* + pcDNA-SRC + 联合用药组细胞增殖抑制率和凋亡

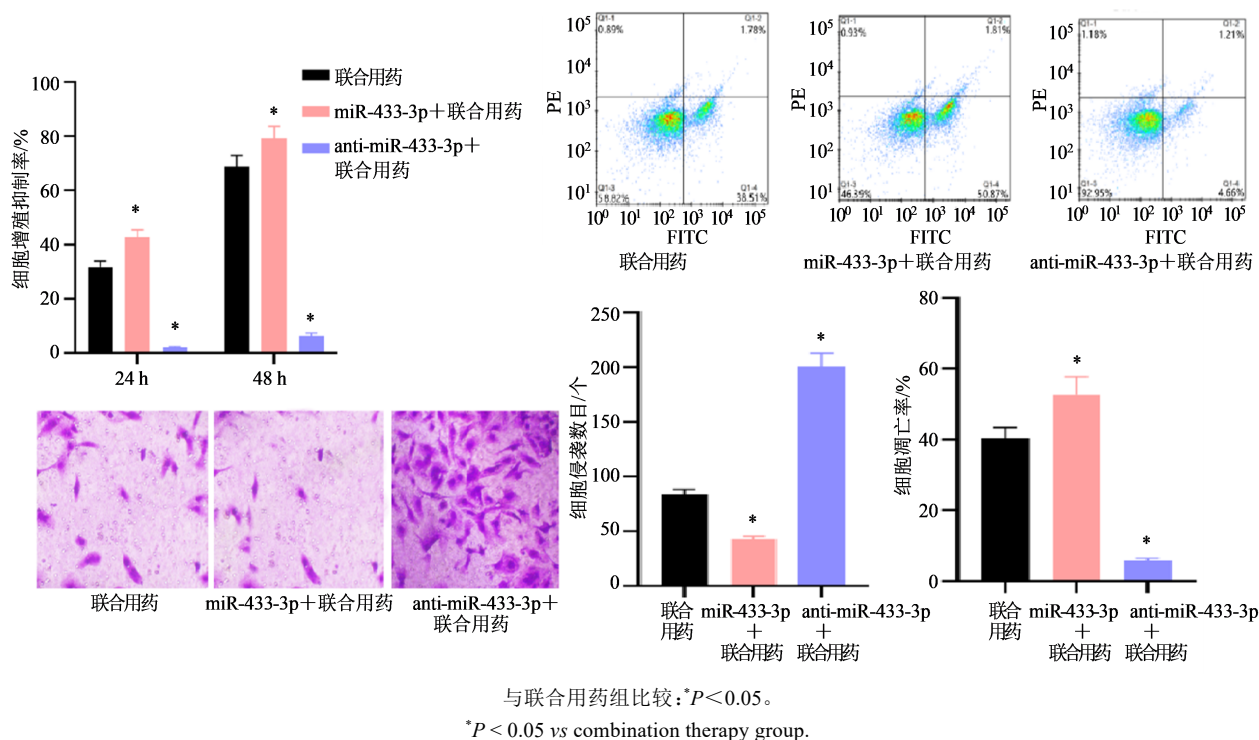


图3 miR-433-3p对黄芩苷联合奥沙利铂处理后SGC-7901增殖、侵袭和凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 3 Effect of miR-433-3p on the proliferation, invasion, and apoptosis ability of SGC-7901 after treatment with baicalin combined with oxaliplatin ($\bar{x} \pm s, n=6$)

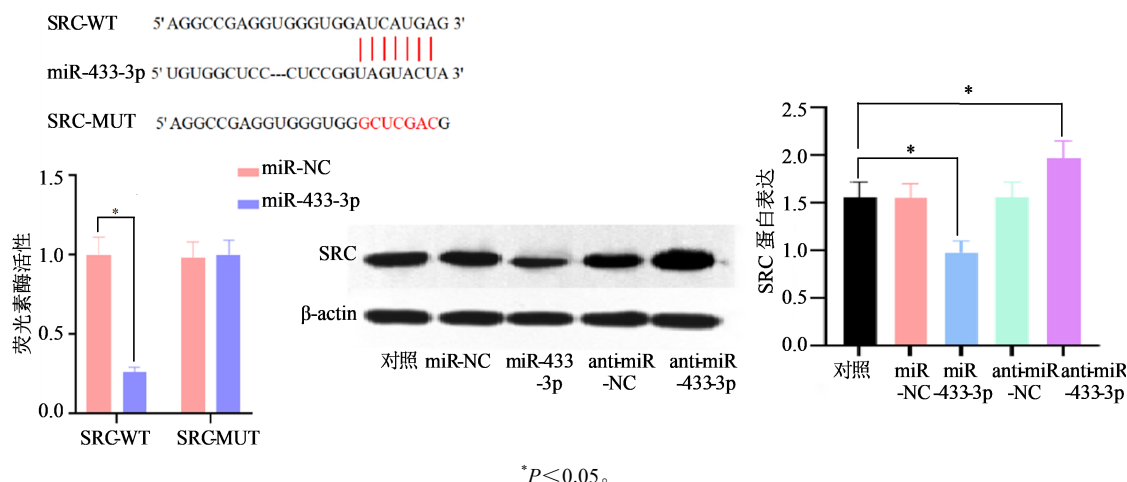


图4 miR-433-3p靶向调控SRC($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 4 miR-433-3p Targeted Regulation of SRC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

率显著高于pcDNA-SRC+联合用药组($P < 0.05$), 细胞侵袭数目显著低于pcDNA-SRC+联合用药组($P < 0.05$);联合用药组和miR-433-3p+pcDNA-SRC+联合用药组细胞增殖、侵袭和凋亡相比无统计学差异。

4 讨论

胃癌是全球常见的胃肠道疾病,在世界范围内也是位居第5位的恶性肿瘤^[14]。由于缺乏特异性生物标志物,多数新诊断的胃癌患者在确诊时已处于

晚期,通常会错过最佳的治疗机会。目前临床上常用的治疗胃癌的药物大多存在消化道不良反应等副作用,不仅加重了胃癌疾病的进展且影响患者生存质量^[15]。因此探究胃癌的发病机制,并确定与胃癌相关的特异性标志物对有效治疗胃癌尤为重要。黄芩是中国最传统的中药品种之一,具有清热燥湿和泻火解毒的作用,其中黄芩苷是黄芩中研究最广泛的一种黄酮类化合物^[16]。现代医学表明^[17],黄芩苷具有多种药理作用,如抗肿瘤、广谱抗菌、抗炎

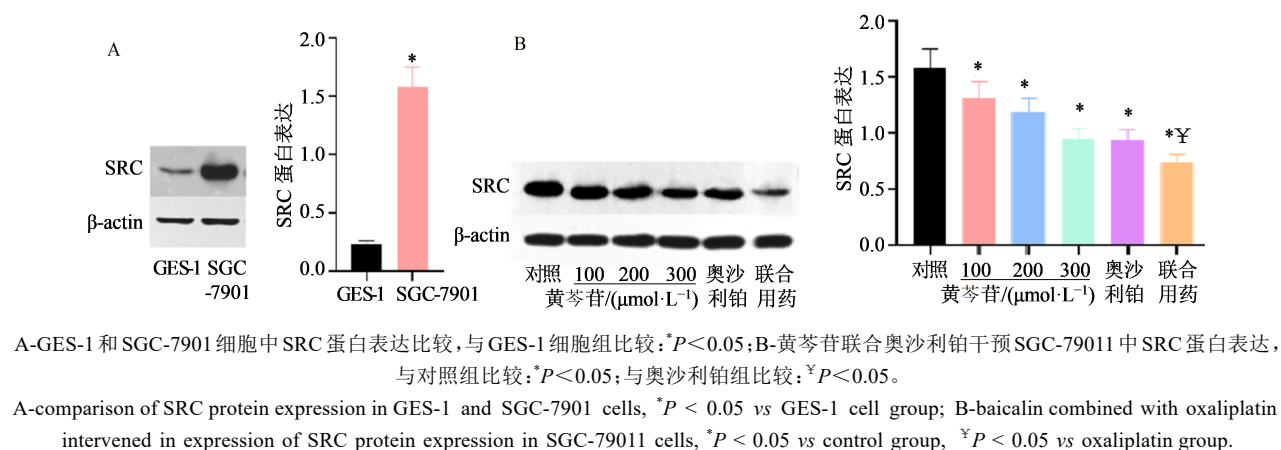
图5 黄芩苷联合奥沙利铂调控SRC蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 5 Baicalin combined with oxaliplatin regulated SRC protein expression ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

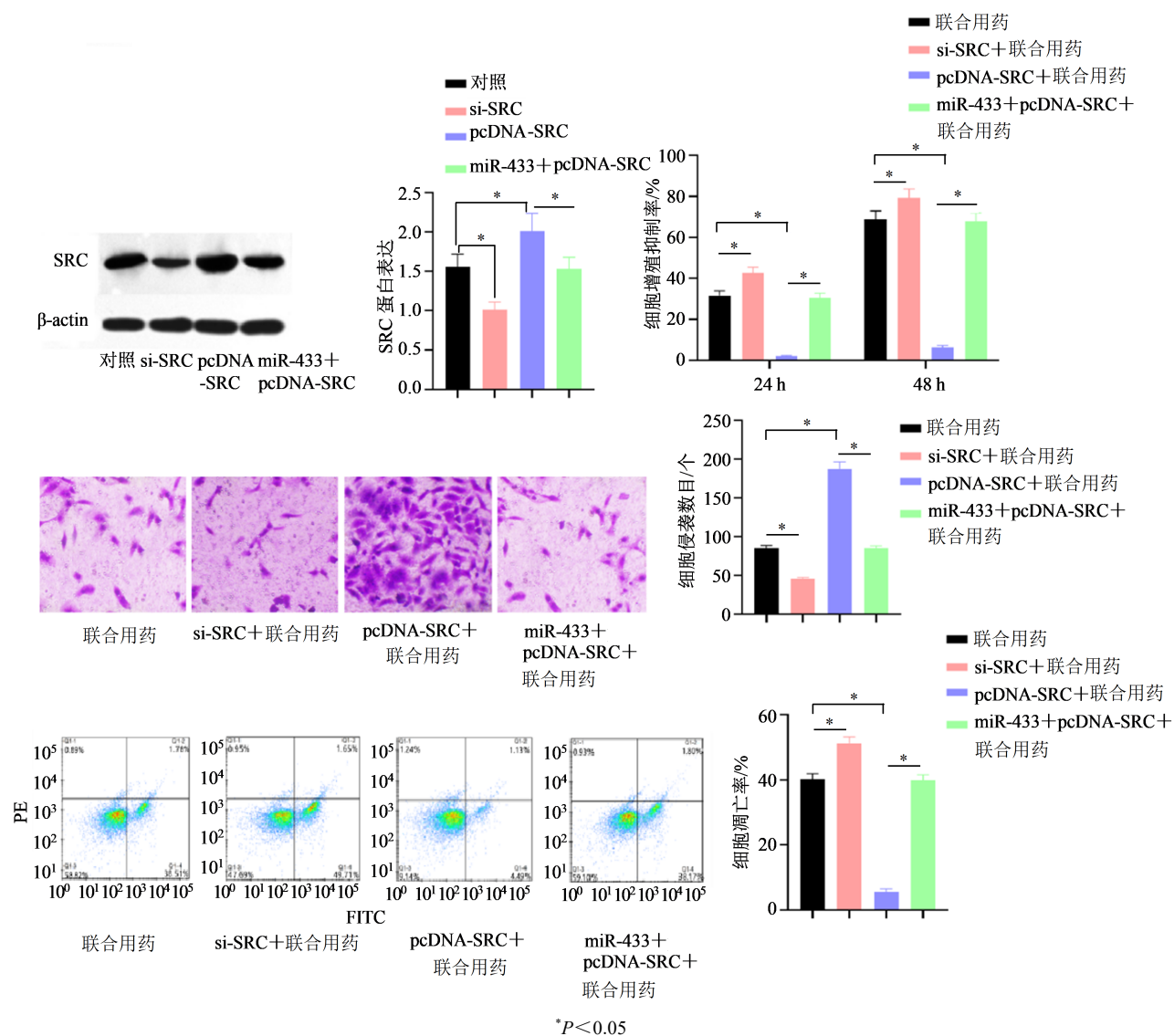
图6 黄芩苷联合奥沙利铂调控 miR-433-3p/SRC 轴调节 SGC-7901 细胞增殖、侵袭和凋亡 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 6 Baicalin combined with oxaliplatin regulates miR-433-3p/SRC axis to regulate SGC-7901 cell proliferation, invasion, and apoptosis ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

等,其可诱导肿瘤细胞凋亡和周期停滞,进而发挥抗癌作用。有学者研究发现^[18],黄芩苷能抑制黑色素瘤的增殖和生长;Yang等^[19]认为黄芩苷能抑制结直肠癌细胞生长、侵袭并诱导凋亡。奥沙利铂是近年来临床广泛应用的广谱抗癌药物之一。本研究结果显示,黄芩苷和奥沙利铂均能抑制胃癌细胞增殖和侵袭,并诱导凋亡,呈黄芩苷呈剂量相关;当黄芩苷和奥沙利铂联合使用时发现,胃癌细胞的增殖、侵袭能力明显低于单独使用黄芩苷或奥沙利铂,凋亡能力明显高于单独使用黄芩苷或奥沙利铂,由此提示黄芩苷和奥沙利铂均能抑制胃癌细胞增殖和侵袭,并诱导凋亡,黄芩苷和奥沙利铂联合效果更好。

miRNA是长度为22~25 nt的非编码RNA,其在转录后或翻译水平负调控基因表达,可介导细胞多种生物学活性,包括增殖、迁移和侵袭等。罗茜等^[20]研究发现,miR-433-3p在宫颈癌细胞中低表达,过表达miR-433-3p可抑制宫颈癌细胞增殖和侵袭。万智双等^[21]研究发现,miR-433-3p可通过下调丝裂原活化蛋白激酶8表达,进而抑制肝癌细胞的侵袭和迁移。江旭林等^[22]证明下调miR-433-3p可促进结直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移。本研究结果显示,miR-433-3p在胃癌SGC-7901细胞中呈低表达,过表达miR-433-3p可增加黄芩苷联合奥沙利铂对胃癌细胞增殖、侵袭的抑制作用及对凋亡的促进作用;反之,敲减miR-433-3p表达可抑制黄芩苷联合奥沙利铂对胃癌细胞增殖、侵袭的抑制作用及对凋亡的促进作用。由此提示,miR-433-3p可介导胃癌细胞的增殖、侵袭和凋亡,黄芩苷联合奥沙利铂可通过上调miR-433-3p表达抑制胃癌细胞增殖和迁移,促进胃癌细胞凋亡。

肿瘤的发生发展及转移涉及一系列的基因突变及基因异常表达过程。SRC酪氨酸激酶在多种肿瘤中表达异常,其可通过对细胞生长、增殖和黏附等作用的促进作用介导肿瘤的发生和发展。有研究发现^[23],多种胃癌组织中的SRC酪氨酸激酶活性明显高于正常胃组织,且SRC酪氨酸激酶活性增强可促进胃癌的发生及转移能力。本研究通过荧光素酶实验报告发现miR-433-3p可负调控SRC表达,因此猜测,SRC可能成为黄芩苷联合奥沙利铂通过上调miR-433-3p表达调控胃癌细胞活性的作用机制。本研究结果显示,SRC在胃癌细胞中明显升高,低表达SRC可增加黄芩苷联合奥沙利铂对胃癌细胞增殖、侵袭的抑制作用及对凋亡的促进作用;

过表达减弱黄芩苷联合奥沙利铂对胃癌细胞增殖、侵袭的抑制作用及对凋亡的促进作用,同时过表达miR-433-3p和过表达SRC不会影响黄芩苷联合奥沙利铂对胃癌细胞活性的调控作用,由此提示黄芩苷联合奥沙利铂可通过调控miR-433-3p/SRC轴抑制胃癌细胞增殖和侵袭,诱导胃癌细胞凋亡。

黄芩苷联合奥沙利铂可通过miR-433-3p靶向调控SRC抑制胃癌细胞的增殖和侵袭,诱导胃癌细胞凋亡。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lei Z C, Li N, Yu N R, et al. Design and synthesis of novel celastrol derivatives as potential anticancer agents against gastric cancer cells [J]. J Nat Prod, 2022, 85(5): 1282-1293.
- [2] Liu J Y, Yang H J, Deng J, et al. CircRPPH1 promotes the stemness of gastric cancer cells by targeting miR-375/SLC7A11 axis [J]. Environ Toxicol, 2023, 38(1): 115-125.
- [3] Zhang W S, Cui N, Ye J, et al. Curcumin's prevention of inflammation-driven early gastric cancer and its molecular mechanism [J]. Chin Herb Med, 2022, 14(2): 244-253.
- [4] Yang Y, Huang Y Y, Lin W, et al. Host miRNAs-microbiota interactions in gastric cancer [J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 52.
- [5] Li T, Li S P. Circ_0023984 facilitates esophageal squamous cell carcinoma progression by regulating miR-433-3p/REV3L axis [J]. Dig Dis Sci, 2022, 67(3): 892-903.
- [6] 李燕, 马俊旗, 马蓉. LncRNA OSER1-AS1通过调控miR-433-3p影响宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭 [J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(11): 1909-1917.
Li Y, Ma J Q, Ma R. LncRNA OSER1-AS1 affects the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells by regulating miR-433-3p [J]. Chin J Cell Biol, 2020, 42(11): 1909-1917.
- [7] Sridaran D, Chouhan S, Mahajan K, et al. Inhibiting ACK1-mediated phosphorylation of C-terminal Src kinase counteracts prostate cancer immune checkpoint blockade resistance [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 6929.
- [8] Qin Z W, Zhou C Z. HOXA13 promotes gastric cancer progression partially via the FN1-mediated FAK/Src axis [J]. Exp Hematol Oncol, 2022. doi: org/10.1186/s40164-022-00260-7.
- [9] Song L J, Zhu S M, Liu C, et al. Baicalin triggers apoptosis, inhibits migration, and enhances anti-tumor

- immunity in colorectal cancer via TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(3): e13703.
- [10] 许海健, 朱倩, 丁康, 等. 黄芩苷治疗炎症性肠病的作用机制研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(1): 219-223.
- Xu H J, Zhu Q, Ding K, et al. Research progress on action mechanism of baicalin in treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Drugs Clin*, 2023, 38(1): 219-223.
- [11] 吴艳荣, 刘光伟, 刘全忠, 等. 黄芩苷通过上调 miR-190 表达缓解缺氧缺糖对神经细胞损伤的研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(10): 3009-3017.
- Wu Y R, Liu G W, Liu Q Z, et al. Baicalin alleviates damage of nerve cells caused by hypoxia and hypoglycemia by up-regulating expression of miR-190 [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(10): 3009-3017.
- [12] Wang L, Feng T, Su Z L, et al. Latest research progress on anticancer effect of baicalin and its aglycone baicalein [J]. *Arch Pharm Res*, 2022, 45(8): 535-557.
- [13] Wang Y Q, Xie H L, Wu Y, et al. Bioinspired lipoproteins of furoxans-oxaliplatin remodel physical barriers in tumor to potentiate T-cell infiltration [J]. *Adv Mater*, 2022, 34(14): e2110614.
- [14] Otaegi-Ugartemendia M, Matheu A, Carrasco-Garcia E. Impact of cancer stem cells on therapy resistance in gastric cancer [J]. *Cancers*, 2022, 14(6): 1457.
- [15] Ni H W, Ruan G J, Sun C, et al. Tanshinone IIA inhibits gastric cancer cell stemness through inducing ferroptosis [J]. *Environ Toxicol*, 2022, 37(2): 192-200.
- [16] Ibrahim A, Abdel Gaber S A, Fawzi Kabil M, et al. Baicalin lipid nanocapsules for treatment of glioma: Characterization, mechanistic cytotoxicity, and pharmacokinetic evaluation [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2022, 19(11): 1549-1560.
- [17] Jia M, Yang F, Xu Y, et al. Baicalin induced apoptosis of human cholangiocarcinoma cell through activating AMPK/mTORC1/p70S6K signaling pathway [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2022, 173(3): 366-370.
- [18] Synowiec-Wojtarowicz A, Pawłowska-Góral K, Krawczyk A, et al. The effect of a static magnetic field and baicalin or baicalein interactions on amelanotic melanoma cell cultures (C32) [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(4): 3157-3165.
- [19] Yang B L, Bai H R, Sa Y L, et al. Inhibiting EMT, stemness and cell cycle involved in baicalin-induced growth inhibition and apoptosis in colorectal cancer cells [J]. *J Cancer*, 2020, 11(8): 2303-2317.
- [20] 罗茜, 贺细菊, 范丽. miR-433-3p 靶向 MFAP5 调控宫颈癌细胞氧化应激的机制 [J]. *生物技术*, 2022, 32(4): 445-450.
- Luo Q, He X J, Fan L. Mechanism of miR-433-3p targeting MFAP5 in regulating oxidative stress in cervical cancer cells [J]. *Biotechnology*, 2022, 32(4): 445-450.
- [21] 万智双, 熊丁, 曹宸. miR-433-3p 靶向 MAPK8 对肝癌细胞 MHCC97H 增殖、凋亡和迁移的调控作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(1): 57-62.
- Wan Z S, Xiong D, Cao C. Regulation of miR-433-3p targeting MAPK8 on proliferation, apoptosis and migration of hepatoma cells MHCC97H [J]. *Chin J Immunol*, 2020, 36(1): 57-62.
- [22] 江旭林, 范星, 汤俊, 等. LncRNA OSER1-AS1 靶向 miR-433-3p 对结直肠癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2020, 25(5): 603-608, 612.
- Jiang X L, Fan X, Tang J, et al. Effect of LncRNA OSER1-AS1 on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells by targeting miR-433-3p [J]. *Mod Dig Interv*, 2020, 25(5): 603-608, 612.
- [23] Poh A R, Dwyer A R, Eissmann M F, et al. Inhibition of the SRC kinase HCK impairs STAT3-dependent gastric tumor growth in mice [J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8(4): 428-435.

[责任编辑 兰新新]