

苦参碱上调 LncRNA BDNF-AS 抑制宫颈鳞癌细胞增殖的机制研究

刘平¹, 陈晓杰^{2*}

1. 河南省南阳市第二人民医院, 河南 南阳 473000

2. 河南科技大学医学院, 河南 洛阳 471003

摘要: **目的** 探讨苦参碱抑制宫颈鳞癌细胞增殖的分子机制。**方法** CCK-8 法检测苦参碱对宫颈癌细胞 SiHa 和 C33A 存活率的影响; 流式细胞仪检测细胞周期; 高通量测序技术检测苦参碱作用前后宫颈鳞癌细胞中差异表达的 RNA。qRT-PCR 和 Western blotting 法检测人脑源性神经营养因子 (BDNF)-AS、BDNF mRNA 和蛋白在宫颈鳞癌细胞及异体种植瘤组织中的表达。收集 2013 年 3 月—2016 年 12 月河南省南阳市第二人民医院 32 例宫颈鳞状细胞癌组织, 运用 qRT-PCR 法检测宫颈鳞状细胞癌组织中 BDNF-AS 的表达。**结果** 苦参碱能够明显抑制宫颈鳞癌细胞的增殖。苦参碱作用前后, 共筛选出 924 个差异表达基因。其中 637 个 (68.9%) 基因表达水平上调, 287 个 (31.1%) 基因表达水平下调。苦参碱能上调 BDNF-AS 基因的表达水平。qRT-PCR 显示 BDNF-AS 的表达与宫颈鳞状细胞癌病理分化程度和临床分期之间存在负相关 ($P < 0.05$), 其表达与预后相关 ($P = 0.04$)。Cox 回归多因素分析发现 BDNF-AS 可作为宫颈鳞状细胞癌患者独立的预后因子。**结论** BDNF-AS 在宫颈鳞状细胞癌的发生发展中可能发挥抑癌作用, 苦参碱可能通过上调 BDNF-AS 抑制宫颈鳞状细胞癌的增殖。

关键词: 苦参碱; 宫颈鳞状细胞癌; 高通量测序; BDNF-AS; 人脑源性神经营养因子

中图分类号: R961.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)06-1593-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.06.028

Mechanism of matrine inhibiting proliferation of cervical squamous carcinoma cells by up-regulating LncRNA BDNF-AS

LIU Ping¹, CHEN Xiao-jie²

1. The Second People's Hospital of Nanyang, Nanyang 473000, China

2. Medicine College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of matrine inhibiting the proliferation of cervical squamous cancer cells. **Methods** CCK-8 method was used to detect the effect of matrine on the survival rate of SiHa and C33A cells, and flow cytometry was used to detect cell cycle. High throughput sequencing technology was used to screen the differentially expressed genes between control cells and cells being treated with matrine. qRT-PCR and Western blotting method were used to detect the expression of BDNF-AS and BDNF in cervical squamous cancer cells and allograft tumor tissue. A total of 32 cases of cervical squamous cell carcinoma tissues were collected in the Second People's Hospital of Nanyang from March 2013 to December 2016. qRT-PCR was used to detect the expression of BDNF-AS in cervical squamous cell carcinoma tissues of these cases. **Results** Matrine significantly inhibited the proliferation of cervical squamous carcinoma cells. A total of 924 differentially expressed genes were screened out from cervical squamous carcinoma cells before and after being treated with matrine, 637 (68.9%) were up-regulated while 287 (31.1%) were down-regulated. Matrine up-regulated the expression of BDNF-AS. The expression of BDNF-AS was negative correlated with the degree of pathological differentiation and clinical stage ($P < 0.05$). BDNF-AS expression in tissues was associated with survival of patients with cervical squamous cell carcinoma. Multivariate analyses suggested the expression of BDNF-AS was served as an independent predictor for overall survival. **Conclusion** BDNF-AS may be a tumor suppressor in the tumorigenesis and tumor progression of cervical squamous cell carcinoma. Matrine may inhibit the proliferation of cervical squamous carcinoma cells by up-regulating the expression of BDNF-AS.

Key words: matrine; cervical squamous cell carcinoma; high-throughput sequencing; BDNF-AS; BDNF

收稿日期: 2019-09-03

基金项目: 河南科技大学博士启动基金 (13480044)

作者简介: 刘平 (1984—), 医学学士, 主治医师, 从事妇科肿瘤临床、科研工作。Tel: 15893559532 E-mail: m18538827625@163.com

*通信作者 陈晓杰 (1981—), 医学博士, 讲师, 从事病理生理学教学、科研工作。Tel: 13393792756 E-mail: chenxj2756@163.com

宫颈癌是全球最常见的妇科恶性肿瘤之一。我国宫颈癌的发病率逐年增高,每年新确诊的病例超过 98 000 例,有近 31 000 例死亡^[1]。此外,有淋巴结转移的患者预后较差,整体存活率极低^[2-3]。研究宫颈癌发病及进展的分子机制对于发现特异的生物标志物和新的治疗药物并最终改善预后、延长患者生存期至关重要。

从豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根、植株、果实提取的苦参碱,是一种具有抗肿瘤活性的生物碱,目前研究发现其对非小细胞性肺癌^[4]、结肠癌^[5]、宫颈癌^[6-7]、前列腺癌^[7]和人类成神经管细胞瘤^[8]等多种肿瘤细胞具有抑制作用,但苦参碱对宫颈癌细胞的作用机制研究相对缺乏。本研究观察苦参碱对宫颈鳞癌细胞增殖的影响,并通过高通量测序检测苦参碱作用前后宫颈鳞癌细胞中差异表达的 RNA。最后在宫颈鳞状细胞癌组织及其正常组织中检测筛选出的差异基因的表达情况,分析其与宫颈鳞状细胞癌临床病理特征的相关性及其预后意义。

1 材料

1.1 细胞

宫颈癌细胞 SiHa 和 C33A 由郑州大学中英分子肿瘤研究中心惠赠。

1.2 临床样本和病理资料收集

收集 2013 年 3 月—2016 年 12 月南阳市第二人民医院妇科接受根治性子宫切除术和盆腔淋巴结清扫术的 32 例宫颈鳞状细胞癌患者,年龄 32~68 岁,平均年龄 47.2 岁。根据国际妇产科联合会 (FIGO) 的诊断标准分期,32 例宫颈鳞状细胞癌病例中 10 例为 I 期患者,13 例 II 期患者,9 例 III 期患者。7 例有淋巴结转移、25 例无淋巴结转移;分化良好 (G1) 8 例、中度分化 (G2) 15 例、低分化 (G3) 9 例。所有患者术前均未接受化疗或放疗;所有病例均有病理组织学诊断支持;所有标本直接取自手术切除物。在手术切除后 10 min 之内获得。取材后置于无菌冻存管中,储存至 -80 °C。

1.3 试剂与仪器

苦参碱 (200 mg/支,质量分数≥98%),鼎瑞化工 (上海) 有限公司; TRIzol 总 RNA 提取试剂、SuperRT cDNA Synthesis Kit、荧光定量 PCR 试剂盒 (康为世纪生物科技有限公司);兔抗人脑源性神经生长因子 (BDNF) 一抗 (美国 abcam 公司);胎牛血清 (以色列 BI 公司)。

Biotek Epoch 微量核酸定量仪购自美国 Biotek 公司;7500 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.4 引物序列

通过 PCR 引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 12 个差异表达基因及 GAPDH 的引物序列,具体序列见表 1。引物由上海生工生物有限公司合成,引物干粉离心后用 DEPC 水配制成 20 μmol/L,置于 -20 °C 冰箱备用。

表 1 引物序列
Table 1 Sequence of primers

基因	序列 (5'→3')	长度/ bp
BDNF-AS	正向: AGGAGTGGTTGCATTTGGGA	121
	反向: CCCACCACGCAGTGAATAGT	
BDNF	正向: AGCACCAGTTGCATAAGGGA	107
	反向: TCGTGGTCGCAGCTTATAGT	
SSBP1	正向: CCCATAGCTCTAGCCGTTTCG	84
	反向: AGCTAAGGTAGCCCCCTCCAA	
RPS11	正向: AAGCTAAGCTCCCCGAAACC	128
	反向: CAGCTATCACCAGGCTCGTT	
Fe-S	正向: GCCTTCCTCACCCTTGTTGA	109
	反向: TTACTGCGTCTGCGATTGGT	
CUDR	正向: CTTTCGCTGCCCCCTCAATA	91
	反向: ATTAGGCGACTGGGTGTTGG	
PVT1	正向: CAAGCCCCCTACGAATGTGGT	150
	反向: GCTTGTTGGTTTGTGACGCT	
91H	正向: ATCGAGTCCGCTAACACGTC	72
	反向: GGTTAGGGATGTGGCAACGA	
PTENP1	正向: ATACCCCTTTGCACTTGTGG	84
	反向: ACATGCAAGAATGCAGCAAAAC	
ERICH3	正向: CTACAGCGGCAAGCTTTTGG	104
	反向: GGACTTGCATCCCGTTGAGA	
BAP1	正向: GGGCCGTCGCGCCTT	189
	反向: CCAGCCAGCCCTTATTCATCTT	
COL3	正向: TGAAGCTCCCAGAATGCCAG	136
	反向: GCTGCCCTGGTAGGTTTCT	
GAPDH	正向: GGAAGGACTCATGACCACAGTCC	101
	反向: TCGCTGTGGAAGTCAGAGGAGACC	

2 方法

2.1 细胞培养

SiHa 和 C33A 细胞采用 RPMI 1640 培养基,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养。取对数生长期细胞进行实验。

2.2 CCK-8 法测定细胞存活率

将对数生长期的细胞制成单细胞悬液,按每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,常规条件培养,24 h 后换液,分别加入含 0、50、250、500、1 000、2 000、4 000 $\mu\text{g/mL}$ 苦参碱的 10% FBS 培养液 100 μL ,每组 5 个复孔,留取空白孔调零,分别于 24、48、72 h 后每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,4 h 后在 450 nm 处检测吸光度 (A) 值。以苦参碱质量浓度为横坐标,抑制率为纵坐标绘制抑制曲线,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{对照}})$$

2.3 苦参碱对 SiHa 细胞周期的影响

将对数生长期的 SiHa 细胞接种在 6 孔板中,每孔 1×10^4 个细胞,继续培养 24 h,当细胞密度达到 70%~80% 时加入苦参碱 500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ ^[5],另设对照组,24 h 后收集细胞,PBS 漂洗 2 遍,加入配好的 PI 染液,室温避光孵育 15~30 min,流式细胞计数仪检测细胞周期。

2.4 总 RNA 的提取和反转录

将对数生长期的 SiHa 细胞接种在 6 孔板中,每孔 1×10^4 个细胞,继续培养 24 h,当细胞密度达到 70%~80% 时加入苦参碱 500、1000 $\mu\text{g/mL}$,另设对照组,24 h 后收集细胞。使用 TRIzol 法进行总 RNA 提取,具体方法参照 TRIzol 总 RNA 提取试剂使用说明。分光光度法进行 RNA 定量。按照 SuperRT cDNA Synthesis Kit 的 RNA 逆转录试剂盒说明书进行逆转录,反应体系为总 RNA 1 μg 、dNTP Mix 4 μL 、primer mix 2 μL 、SuperRT 1 μL 、5 $\times$ SuperRT Buffer 4 μL ,总体积 20 μL 。程序为 42 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 min,经逆转录形成 cDNA。

2.5 高通量测序

1 000 $\mu\text{g/mL}$ 苦参碱作用 SiHa 细胞 48 h 后,提取总 RNA,样本检测合格后,对总 RNA 进行片段选择,通过胶分离技术收集 50~100 bp 的 RNA 片段。在分离得到的 RNA 片段的两端分别连接上接头,反转录成 cDNA,进行 PCR 扩增建立测序文库。对检验合格的测序文库采用 PE50 测序策略进行 Illumina HiSeq 高通量测序。

2.6 差异基因的 qRT-PCR 验证

使用 qRT-PCR 试剂盒对差异基因进行验证,反应体系为逆转录产物 2 μL 、正向引物 2 μL 、反向引物 2 μL 、2 $\times$ mix 10 μL 、纯水 4 μL ,总体积 20 μL 。1 个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 、

30 s,共 40 个循环。所有样本重复 3 次。差异基因验证以 GAPDH 作为内参,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示基因的相对表达水平。

2.7 体内实验观察苦参碱对异体移植宫颈癌细胞生长的影响

BALB/c 小鼠共 10 只,随机分为模型组和苦参碱组 (100 mg/kg),每组 5 只。SiHa 细胞 (1×10^6 个) 悬浮在 1 mL PBS 中,皮下种植裸鼠的右侧腋下。当肿瘤体积达到 100 mm^3 ,实验第 8 天开始给药,对照组小鼠 ip PBS,苦参碱组小鼠 ip 苦参碱 100 mg/kg^[9],每日给药 1 次,每周给药 5 次。每天测量肿瘤大小,计算肿瘤体积 (V)。实验持续 6 周结束后,脱颈处死小鼠,收集肿瘤组织,测量固定后进行组织学研究。

$$V = a \times b^2 / 2$$

a 为肿瘤最长轴, b 为肿瘤最短轴

2.8 Western blotting 检测 BDNF 蛋白表达

裸鼠肿瘤组织分离后,提取总蛋白并用紫外吸收法进行定量。然后电泳分离,转膜,封闭,兔抗人 BDNF 一抗 1:1 000 孵育过夜,洗膜,二抗 1:3 000 孵育 1.5 h, ECL 显影, GAPDH 为内参,使用 ImageLab 4.0 软件计算 BDNF 蛋白相对表达量。

2.9 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。实验独立重复 3~5 次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, BDNF-AS 表达与临床资料联合分析采用 pearson 相关分析,采用 Kaplan-Meier 法计算生存函数,以 Log-rank 检验生存之间的差异,采用单因素和多因素 Cox 回归计算风险比例及 95% 置信区间,分析各因素对宫颈鳞状细胞癌预后的影响。

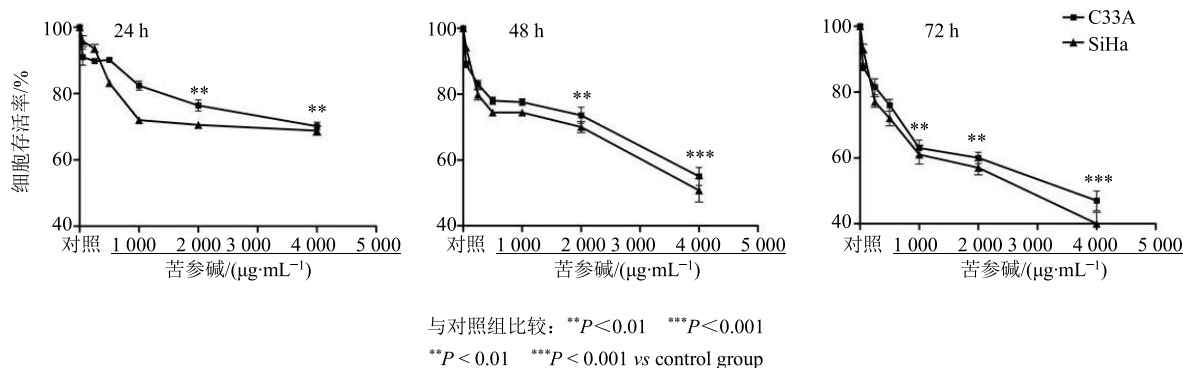
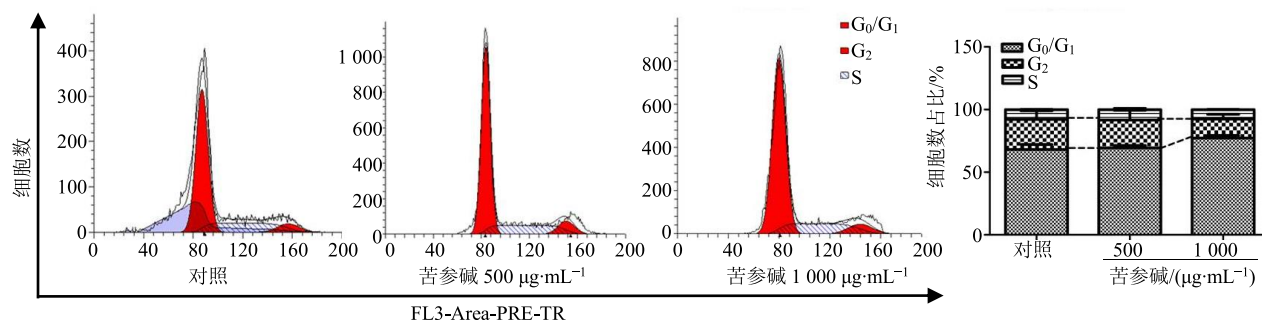
3 结果

3.1 苦参碱对 SiHa、C33A 细胞增殖的影响

苦参碱处理 24、48、72 h 后,用 CCK-8 方法检测 SiHa、C33A 细胞的增殖情况,结果显示苦参碱能够明显抑制 SiHa、C33A 细胞增殖,且具有时间和质量浓度依赖性,苦参碱质量浓度高于 500 $\mu\text{g/mL}$ 时,差异显著 ($P < 0.01$ 、0.001)。其中 C33A 细胞对苦参碱的敏感性小于 SiHa 细胞,但差异不显著,见图 1。

3.2 苦参碱对 SiHa 细胞周期的影响

苦参碱 500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 处理 SiHa 细胞 24 h 后,碘化丙啶染色,进行流式细胞计数。结果显示,与对照组比较,苦参碱能够诱导细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期 (图 2)。

图 1 苦参碱对 SiHa 和 C33A 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Fig. 1 Effect of matrine on proliferation of SiHa and C33A cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)图 2 苦参碱对 SiHa 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 2 Effects of matrine on cell cycle of SiHa cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 苦参碱对 SiHa 细胞差异表达基因的影响

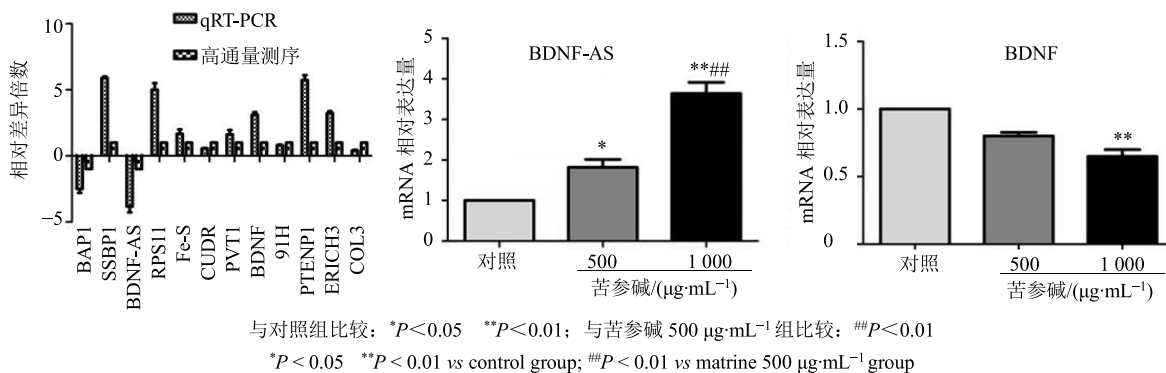
利用 TPM (Trans Per Million) 计算 2 样本间差异表达基因的表达式, 实验选取了表达式差异倍数在 2 倍及以上的基因为差异表达基因。结果显示, 共筛选出 924 个差异表达基因。其中 637 (68.9%) 基因表达上调, 而 287 (31.1%) 基因表达下调。差异表达基因中大多数是编码基因。约 226 (24.5%) 为未知/假设功能基因。从这些基因中选择了差异显著的 12 个基因 [$\log_2$ (差异倍数) > 4 或 $\log_2$ (差异倍数) < -4] 进行 qRT-PCR 验证 (图 3)。

3.4 苦参碱对 SiHa 细胞 BDNF-AS、BDNF mRNA 表达的影响

苦参碱 500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 作用 48 h 后, qRT-PCR 结果显示, 苦参碱能够明显上调 SiHa 细胞 BDNF-AS mRNA 的表达水平, 下调 BDNF mRNA 的表达水平 (图 3)。

3.5 苦参碱对体内 SiHa 细胞生长的影响

裸鼠皮下接种 SiHa 细胞, 肿瘤达到 100 mm^3 的平均时间为 1 周, 且苦参碱组无小鼠死亡。结果显示, 与模型组比较, 苦参碱组裸鼠肿瘤生长抑制

图 3 苦参碱对 SiHa 细胞差异表达基因的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effects of matrine on differentially expressed genes in SiHa cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

作用明显(图 4)。2 组裸鼠体质量变化无显著差异。结果表明,苦参碱抑制体内宫颈癌细胞的生长。

3.6 苦参碱对肿瘤组织中 BDNF-AS mRNA 和 BDNF mRNA、蛋白表达的影响

与模型组比较,苦参碱组裸鼠肿瘤中 BDNF-AS mRNA 表达水平均显著升高($P<0.01$)。BDNF mRNA 和蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$ 、 0.01 , 图 5)。

3.7 BDNF-AS mRNA 的表达与临床病理特征的相关性

应用 qRT-PCR 检测 32 例宫颈鳞状细胞癌组织中 BDNF-AS mRNA 的表达。结果表明,肿瘤组织中 BDNF-AS mRNA 的表达水平与病理分级($P=0.015$)有负相关性,即肿瘤恶性程度越高,BDNF-AS mRNA 表达水平越低。BDNF-AS mRNA 的表达

水平与临床分期亦呈负相关($P=0.029$),即临床分期越高,表达水平越低,见表 2。

3.8 BDNF-AS 基因表达对宫颈鳞状细胞癌患者的影响

根据癌组织中 BDNF-AS 表达量的中位数,将宫颈癌患者分为 BDNF-AS 高表达组和低表达组。所有患者均获得随访,末次随访时间为 2018 年 3 月。随访时间 7~58 个月,复发 17 例,死亡 9 例,9 例均因复发转移死亡。在宫颈鳞状细胞癌患者中,BDNF-AS 高表达患者的中位生存期为 58 个月,而低表达患者的中位生存期为 20 个月($P=0.040$, 图 6)。Cox 单变量分析表明病理分级、临床分期和 BDNF-AS 的表达情况与生存相关(表 3)。Cox 比例风险模型多变量分析表明 BDNF-AS 表达情况是独立的危险因素($P=0.041$, 表 3)。

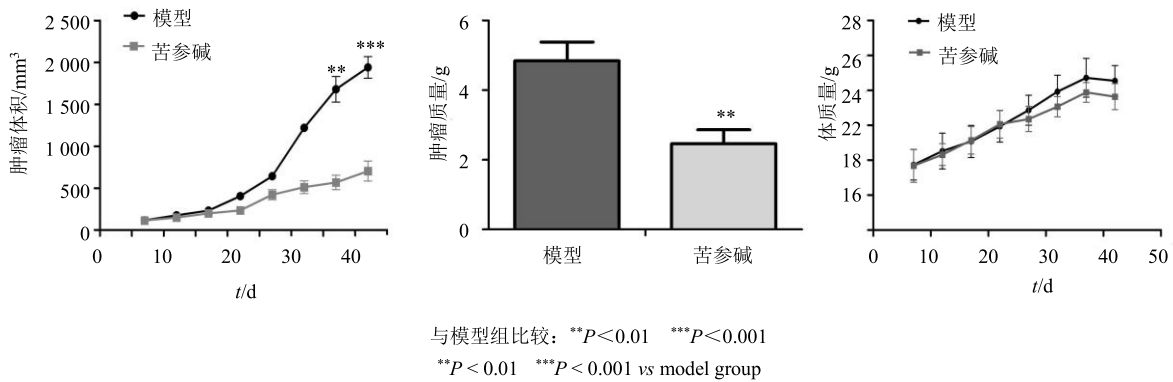


图 4 苦参碱对裸鼠体内 SiHa 细胞移植瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 4 Effect of matrine on growth of SiHa cell transplanted tumor in nude mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

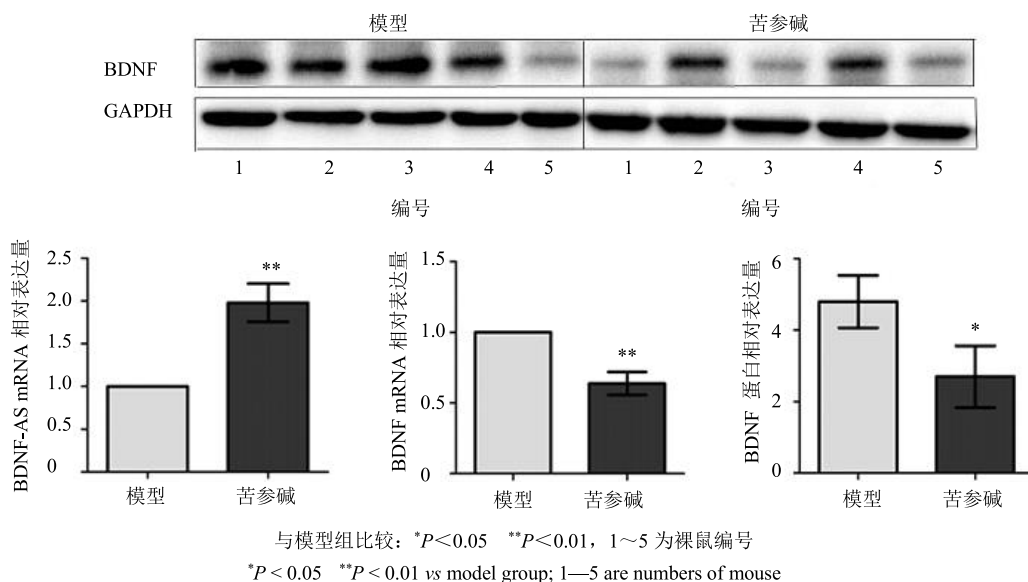


图 5 苦参碱对肿瘤组织中 BDNF-AS、BDNF mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 5 Effect of matrine on mRNA and protein expression of BDNF-AS and BDNF ($\bar{x} \pm s, n=5$)

表 2 BDNF-AS 的表达与宫颈鳞状细胞癌临床病理特征的相关性

Table 2 Correlation of BDNF-AS expression and clinical pathological characteristics of cervical squamous cell carcinoma

临床特征	n	BDNF-AS 相对表达量	P
年龄			
<60	17	8.32±1.32	0.074
≥60	15	8.67±1.26	
肿瘤家族史			
否	19	8.72±1.17	0.401
是	13	7.97±2.12	
病理分级			
低-中分化	23	8.92±1.62	0.015*
高分化	9	8.09±1.53	
临床分期			
< II	10	8.79±2.09	0.029*
≥ II	22	8.18±1.21	

*P<0.05

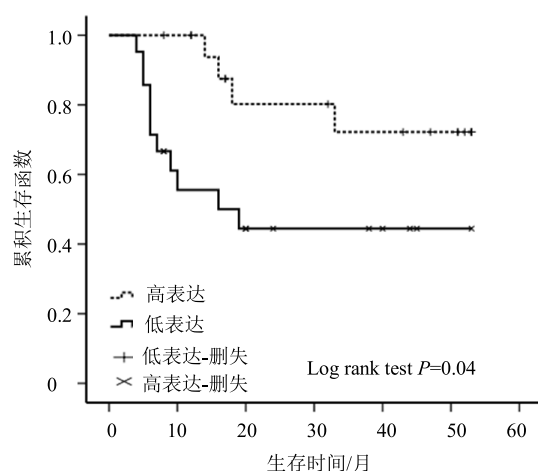


图 6 BDNF-AS 基因表达对宫颈鳞状细胞癌患者的影响

Fig. 6 Effect of BDNF-AS gene expression in patients with cervical squamous cell carcinoma

表 3 32 例宫颈鳞状细胞癌患者不同预后因素对总生存期的单因素和多因素分析

Table 3 Univariate and multivariate analysis of overall survival in 32 patients with cervical squamous cell carcinoma

预后因素	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
年龄 (>60/≤60)	0.627	0.316~1.411	0.402	0.737	0.529~3.175	0.513
分化程度 (低/高+中分化)	2.626	1.816~3.905	0.032*	3.624	0.925~6.353	0.082
临床分期 (<IIIb/≥IIIb)	6.944	3.146~9.222	0.047*	7.263	2.918~8.256	0.033*
BDNF-AS (高/低)	0.736	0.491~0.961	0.029*	0.621	0.462~0.819	0.041*

HR-风险比, CI-置信区间; *P<0.05

HR-hazard ratio, CI-confidence interval; *P<0.05

G₀/G₁ 期。高通量测序结果显示, 苦参碱作用前后, 在宫颈癌细胞中共筛选出 924 个差异表达基因。其中 637 (68.9%) 基因表达上调, 287 (31.1%) 基因表达下调。差异表达基因中大多数是编码基因, 约 226 (24.5%) 为未知/假设功能基因。经过 qRT-PCR 验证发现苦参碱能够明显上调宫颈鳞癌细胞中 BDNF-AS 的表达, 下调 BDNF 的表达。有研究报道, BDNF-AS 能够下调 (或被下调) BDNF 基因的表达^[16], 推测在人宫颈癌中, BDNF 的表达量受

4 讨论

天然植物有效成分的提取及应用是癌症治疗研究的热点^[10-11]。苦参碱是从苦参的根、植株、果实中提取的活性生物碱, 已被证明具有广泛而确切的抗肿瘤作用, 其作用机制可能与抑制肿瘤细胞 DNA 合成、阻滞细胞周期转换、调节癌基因或者抑癌基因表达、干扰细胞信号转导通路等有关^[12]。另外还有研究报道, 苦参碱还可调节肿瘤细胞自噬与凋亡、逆转肿瘤细胞耐药性及增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。苦参碱的这些作用与促进自噬相关标志物的表达、抑制多药耐药性相关蛋白的表达有关^[13-15]。苦参碱抑制宫颈癌细胞增殖的确切机制目前尚不清楚。本研究初步探讨了苦参碱在宫颈鳞癌细胞中的作用机制。发现苦参碱能够抑制宫颈癌细胞生长, 具有质量浓度和时间依赖性。苦参碱能够将细胞周期阻滞在

BDNF-AS 调控。基于这一假设, 采用 qRT-PCR 技术在对照宫颈鳞癌细胞和苦参碱作用 48 h 后的宫颈鳞癌细胞中检测了 BDNF 和 BDNF-AS 的表达情况, 证明苦参碱在体外宫颈鳞癌细胞中上调 BDNF-AS 表达的同时能够下调 BDNF 的表达。

BDNF-AS 是一个长链非编码 RNA, 与 BDNF 的神经营养作用不同, BDNF-AS 在中枢和周围神经系统的作用与 BDNF 相反, 具有神经毒性^[17]。BDNF 在神经干细胞分化过程中具有关键的调控作

用^[8],而且很多研究表明 BDNF 在许多肿瘤中表达异常^[18]。有研究表明 BDNF 在宫颈癌组织中高表达^[19]。BDNF 在肿瘤发生发展过程中可能发挥关键的调节作用^[18-19],BDNF-AS 与 BDNF 具有明确的调控关系^[17]。因此,把二者联合起来进行探讨十分必要。裸鼠皮下异体种植实验表明,苦参碱能够显著抑制宫颈鳞癌细胞的增殖,并且在上调 BDNF-AS 表达的同时下调 BDNF 的表达,该结果与体外细胞实验结果一致。最后,本研究在宫颈癌及正常组织中检测了 BDNF-AS 的表达情况。qRT-PCR 分析显示,BDNF-AS 在宫颈鳞癌组织中显著下调。最新研究发现,BDNF-AS 在成视网膜细胞瘤和非小细胞肺癌细胞系和原位肿瘤中明显下调^[20-21],而 BDNF 能够促进多种肿瘤细胞的体外增殖^[19-20]。这些研究结果与本研究结果基本一致。由此,推测 BDNF-AS 可能在大多数人类肿瘤中具有抑癌基因的作用,其抑癌作用的发挥与 BDNF 的表达量下降有关。本研究结果结合文献研究成果^[19-20]表明,BDNF-AS 对癌细胞具有调节作用,可能是抗癌治疗的一个潜在目标。进一步从分子水平验证 BDNF-AS 的作用机制将是以后的研究方向。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China [J]. *CA*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Pimple S, Mishra G, Shastri S. Global strategies for cervical cancer prevention [J]. *Curr Opin Obstet Gyn*, 2016, 28(1): 4-10.
- [3] Yee G P, De Souza P, Khachigian L M. Current and potential treatments for cervical cancer [J]. *Curr Cancer Drug Target*, 2013, 13(2): 205-220.
- [4] An Q, Han C, Zhou Y, *et al.* Matrine induces cell cycle arrest and apoptosis with recovery of the expression of miR-126 in the A549 non-small cell lung cancer cell line [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4042-4048.
- [5] Zhang S, Cheng B, Li H, *et al.* Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of human colon cancer LoVo cells by inactivating Akt pathway [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(4): 2101-2108.
- [6] Wang Q, Du H, Geng G, *et al.* Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis via BID-mediated mitochondrial pathway in esophageal cancer cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(5): 3009-3020.
- [7] Li Q, Lai Y, Wang C, *et al.* Matrine inhibits the proliferation, invasion and migration of castration-resistant prostate cancer cells through regulation of the NF-kappaB signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1): 375-381.
- [8] Zhou K, Ji H, Mao T, *et al.* Effects of matrine on the proliferation and apoptosis of human medulloblastoma cell line D341 [J]. *Inter J Clin Exper Med*, 2014, 7(4): 911-918.
- [9] 赵淑婷, 雷 蕾, 程 静. 新苦参碱通过 P38 通路调节 H2AX 磷酸化抑制宫颈癌细胞的增殖及迁移 [J]. 同济大学学报: 医学版, 2018, 39(4): 22-28.
- [10] Gogoi B, Gogoi D, Silla Y, *et al.* Network pharmacology-based virtual screening of natural products from *Clerodendrum* species for identification of novel anti-cancer therapeutics [J]. *Mol Bio Syst*, 2017, 13(2): 406-416.
- [11] Wang X, Xu L, Lao Y, *et al.* Natural products targeting EGFR signaling pathways as potential anticancer drugs [J]. *Curr Prot Peptide Sci*, 2018, 19(4): 380-388.
- [12] 李 琦. 苦参碱在抗肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(4): 500-502.
- [13] Xie B S, He X X, Ai Z L, *et al.* Involvement of beta-catenin in matrine-induced autophagy and apoptosis in WB-F344 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(6): 2547-2553.
- [14] Luo S X, Deng W Y, Wang X F, *et al.* Molecular mechanism of indirubin-3'-monoxime and Matrine in the reversal of paclitaxel resistance in NCI-H520/TAX25 cell line [J]. *Chin Med J*, 2013, 126(5): 925-929.
- [15] Lin Y, Lin L, Jin Y, *et al.* Combination of matrine and sorafenib decreases the aggressive phenotypes of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Chemotherapy*, 2014, 60(2): 112-118.
- [16] Modarresi F, Faghihi M A, Lopez-Toledano M A, *et al.* Inhibition of natural antisense transcripts *in vivo* results in gene-specific transcriptional upregulation [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 453-459.
- [17] Zheng X, Lin C, Li Y, *et al.* Long noncoding RNA BDNF-AS regulates ketamine-induced neurotoxicity in neural stem cell derived neurons [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, doi: 10.1016/j.biopha.2016.05.050.
- [18] Radin D P, Patel P. BDNF: An Oncogene or Tumor Suppressor? [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(8): 3983-3990.
- [19] 陶萍萍, 原杰彦, 郑伟平, 等. 宫颈癌、正常组织酪氨酸激酶受体 B、脑源性神经营养因子、血管内皮生长因子-C 及血管内皮生长因子受体-3 的表达 [J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(11): 2462-2466.
- [20] Shang W, Yang Y, Zhang J, *et al.* Long noncoding RNA BDNF-AS is a potential biomarker and regulates cancer development in human retinoblastoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(4): 1142-1148.
- [21] Shen M, Xu Z, Jiang K, *et al.* Long noncoding nature brain-derived neurotrophic factor antisense is associated with poor prognosis and functional regulation in non-small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2017, doi: 10.1177/1010428317695948.