

青蒿琥酯通过 miR-21/PTEN 通路对人大肠癌 CCL229 细胞恶性生物学行为抑制作用的研究

巩会杰, 唐建荣, 姚兰杰, 冯鹏飞

驻马店市中心医院 消化内科, 河南 驻马店 463000

摘要:目的 探究青蒿琥酯对人大肠癌 CCL229 细胞恶性生物学行为抑制作用的机制。方法 采用 MTT 法检测青蒿琥酯对 CCL229 细胞活力的影响; 通过流式细胞术检测青蒿琥酯对 CCL229 细胞凋亡的影响; 采用 Transwell 法检测青蒿琥酯对 CCL229 细胞侵袭能力的影响; 采用克隆形成实验检测青蒿琥酯对 CCL229 细胞集落形成能力的影响; 采用 Western blotting 法检测青蒿琥酯对 CCL229 细胞内自噬特异性蛋白如自噬效应蛋白 (Beclin1)、轻链 3-I/II 蛋白 (light chain 3-I/II, LC3-I/II)、自噬相关蛋白 5 (autophagy related protein 5, Atg5)、Atg5-Atg12 复合物以及上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白如紧密连接蛋白 (ZO-1)、上皮钙黏蛋白 (epithelial cadherin, E-cadherin)、神经钙黏蛋白 (neuronal cadherin, N-cadherin)、锌指转录因子 (Slug) 和第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 表达的影响; 采用 qRT-PCR 法检测青蒿琥酯对 CCL229 细胞内 miR-21 mRNA 表达的影响; 通过双荧光素酶报告基因实验验证 miR-21 与 PTEN 的靶向关系; 考察过表达或抑制 miR-21 与 PTEN 对青蒿琥酯抑制 CCL229 细胞恶性生物学行为的影响。结果 青蒿琥酯显著降低 CCL229 细胞存活率 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著促进 CCL229 细胞凋亡 ($P < 0.001$), 显著抑制 CCL229 细胞侵袭和克隆形成能力 ($P < 0.001$), 显著上调 CCL229 细胞内 Atg5-Atg12 复合物、Atg5、Beclin1、LC3-I/II、ZO-1、E-cadherin 表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著下调 N-cadherin 和 Slug 蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。CCL229 细胞内 miR-21 mRNA 高表达 ($P < 0.01$), 青蒿琥酯显著抑制 CCL229 细胞内 miR-21 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。过表达 miR-21 显著抑制青蒿琥酯对 CCL229 细胞的促凋亡作用 ($P < 0.001$), 显著减弱青蒿琥酯对 CCL229 细胞侵袭和克隆形成能力的抑制作用 ($P < 0.01$), 显著抑制青蒿琥酯对 CCL229 细胞 Atg5-Atg12 复合物、Atg5、Beclin1、LC3-I/II、ZO-1、E-cadherin 表达水平的上调作用 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著抑制青蒿琥酯对 CCL229 细胞 N-cadherin 和 Slug 蛋白表达水平的下调作用 ($P < 0.01$); 抑制 miR-21 则作用相反。PTEN 是 miR-21 的下游靶基因, 过表达 miR-21 显著抑制 CCL229 细胞内 PTEN 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 抑制 miR-21 显著上调 PTEN 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 过表达 miR-21 显著抑制野生型 PTEN (WT-PTEN) 质粒的荧光素酶活性 ($P < 0.01$)。过表达 PTEN 与抑制 miR-21 表达对 CCL229 细胞作用一致, 同时过表达 miR-21 和 PTEN 不会影响青蒿琥酯对 CCL229 细胞恶性生物学行为的抑制作用。结论 青蒿琥酯能够通过调控 miR-21 和 PTEN 表达诱导 CCL229 细胞凋亡和自噬, 并抑制细胞增殖和侵袭。

关键词: 大肠癌; 青蒿琥酯; miRNA; 增殖; 侵袭; 上皮间质转化; 自噬; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)08-2331-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.016

Inhibitory effect of artesunate on malignant biological behavior of human colorectal cancer CCL229 cells through miR-21/PTEN pathway

GONG Hui-jie, TANG Jian-rong, YAO Lan-jie, FENG Peng-fei

Department of Gastroenterology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of inhibitory effect of artesunate on malignant biological behavior of human colorectal cancer CCL229 cells. **Methods** MTT method was used to detect the effect of artesunate on viability of CCL229 cells; Flow cytometry was used to detect the effect of artesunate on apoptosis of CCL229 cells; Transwell method was used to detect the effect of artesunate on invasion of CCL229 cells; Clone formation experiment was used to detect the effect of artesunate on colony forming ability of CCL229 cells; Western blotting was used to detect the effects of artesunate on expressions of intracellular

收稿日期: 2020-12-22

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (20A320085)

作者简介: 巩会杰 (1980—), 女, 硕士, 主治医师, 从事肝病、炎症性肠病、急性胰腺炎、消化道肿瘤等研究。Email: zmdgonghuijie@126.com

autophagy-specific proteins such as autophagy effector protein (Beclin1), light chain 3-I/II protein (LC3-I/II), autophagy related protein 5 (Atg5), Atg5-Atg12 complex, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins such as tight junction protein (ZO-1), epithelial cadherin (E-cadherin), neuronal cadherin (N-cadherin), zinc finger transcription factor (Slug) and phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) in CCL229 cells; qRT-PCR was used to detect the effect of artesunate on expression of *miR-21* mRNA in CCL229 cells; The dual luciferase reporter gene experiment was used to verify the targeting relationship between *miR-21* and *PTEN*; Effect of overexpression or inhibition of *miR-21* and *PTEN* on biological behavior of artesunate in inhibiting CCL229 cells was investigated. **Results** Artesunate significantly inhibited the survival rate of CCL229 cells ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), promoted the apoptosis of CCL229 cells ($P < 0.001$), inhibited CCL229 cell invasion and clone formation ability ($P < 0.001$), up-regulated the expressions of Atg5-Atg12 complex, Atg5, Beclin1, LC3-I/II, ZO-1, E-cadherin in CCL229 cells ($P < 0.05, 0.01$), and significantly down-regulated the expressions of N-cadherin and Slug ($P < 0.05$). The expression of *miR-21* mRNA in CCL229 cells was high ($P < 0.01$), artesunate significantly inhibited the expression of *miR-21* mRNA in CCL229 cells ($P < 0.05$). Overexpression of *miR-21* significantly inhibited the pro-apoptotic effect of artesunate on CCL229 cells ($P < 0.001$), weakened the inhibitory effect of artesunate on CCL229 cell invasion and clonal formation ($P < 0.01$), inhibited the up-regulation of artesunate on expressions of Atg5-Atg12 complex, Atg5, Beclin1, LC3-I/II, ZO-1, and E-cadherin in CCL229 cells ($P < 0.05, 0.01$), and significantly inhibited the down-regulation of artesunate on expressions of N-cadherin and Slug protein in CCL229 cells ($P < 0.01$); The inhibition of *miR-21* expression had the opposite effect. *PTEN* was the downstream target gene of *miR-21*. Overexpression of *miR-21* significantly inhibited the expression of *PTEN* in CCL229 cells ($P < 0.01$), the inhibited expression of *miR-21* significantly upregulated the expression of *PTEN* ($P < 0.01$), overexpression of *miR-21* significantly inhibited the luciferase activity of wild-type *PTEN* (WT-*PTEN*) plasmid ($P < 0.01$). Overexpression of *PTEN* had the same effect with inhibition of *miR-21* expression on CCL229 cells, while overexpression of *miR-21* and *PTEN* did not affect the inhibitory effect of artesunate on malignant biological behavior of CCL229 cells. **Conclusion** Artesunate can induce apoptosis, autophagy and inhibit cell proliferation and invasion of CCL229 cells by regulating the expression of *miR-21* and *PTEN*.

Key words: colorectal cancer; artesunate; miRNA; proliferation; invasion; epithelial-mesenchymal transition; autophagy; apoptosis

大肠癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一，其发病率和死亡率居高不下^[1]。目前手术、化疗和放疗是治疗大肠癌的主要手段^[2]。5-氟尿嘧啶是用于治疗实体瘤的主要药物，临床广泛应用于大肠癌的治疗，治疗效果较好^[3]，然而化疗对患者带来的不良反应不容小觑，因此寻找有效且不良反应较小的药物对提升大肠癌患者的治疗效果至关重要。

微小 RNA (miRNA, miR) 是一类在真核生物中起转录后调控作用的非编码小分子 RNA，在细胞的增殖、分化、凋亡等多种生物学行为中起重要作用^[4]。研究表明，miRNA 在肿瘤中的异常表达可作为抑癌基因参与大肠癌等多种肿瘤的发生、转移、侵袭等过程，且与患者的预后密切相关^[5-6]。miR-21 在大肠癌患者血清中异常高表达^[7]，且参与大肠癌细胞的增殖、凋亡、侵袭等过程^[8]。青蒿琥酯是从传统中药青蒿中提取出的一种天然倍半萜烯，是治疗疟疾的安全药物^[9]。Efferth 等^[10]发现青蒿琥酯能诱导肿瘤细胞凋亡，对多发性骨髓瘤^[11]、宫颈癌^[12]、乳腺癌^[13]、前列腺癌^[14]等多种肿瘤具有抑制作用，但其抗肿瘤的作用机制尚不清楚。本研究探究青蒿琥酯抑制大肠癌细胞恶性生物学行为的作用机制，

为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 细胞

人大肠癌 CCL229 细胞株和人正常肠上皮 HIEC 细胞株购自上海康朗生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

青蒿琥酯 (60 mg/支) 购自桂林南药股份有限公司；5-氟尿嘧啶 (0.25 g/支) 购自上海旭东海普药业有限公司；胎牛血清 (批号 SA190501)、RPMI 1640 培养基 (批号 C22400500BT)、DMEM 培养基 (批号 C11995500CP)、Trizol 试剂 (批号 15596-026)、PrimeScript 逆转录试剂盒 (批号 RR047A)、SYBR Green Real-Time PCR MasterMix 试剂盒 (批号 RR420A)、Lipofectamine 2000 试剂盒 (批号 11668-027) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；RAPI 蛋白裂解液 (批号 P0013)、BCA 试剂盒 (批号 P0010S) 购自美国 Invitrogen 公司；MTT 试剂盒 (批号 GM01-500T)、Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (批号 40302ES20) 购自上海翊圣生物科技有限公司；Dual-Luciferase Reporter Assay Kit 试剂盒 (批号 ab228530) 购自美国 Promega 公司；Transwell 小室

(批号 353090) 购自美国 Corning 公司; 紧密连接蛋白(ZO-1) 抗体(批号 13663)、上皮钙黏蛋白(epithelial cadherin, E-cadherin) 抗体(批号 3195)、神经钙黏蛋白(neuronal cadherin, N-cadherin) 抗体(批号 61572S)、锌指转录因子(Slug) 抗体(批号 9585)、第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 抗体(批号 9188)、自噬相关蛋白 5(autophagy related protein 5, Atg5) 抗体(批号 9980)、Atg12 抗体(批号 4180)、自噬效应蛋白(Beclin 1) 抗体(批号 3495)、轻链 3-I/II 蛋白(light chain 3-I/II, LC3-I/II) 兔抗人单克隆抗体(批号 4599) 购自美国 CST 公司; β -肌动蛋白(β -actin) 鼠抗人单克隆抗体(批号 20536-1-AP)、HRP 标记的 IgG 抗体购自美国 Protein Tech Group 公司; 引物由山东维真生物科技有限公司设计并合成。

1.3 仪器

超净工作台(苏州净化设备一厂); 恒温培养箱(美国 Forma Scientific 公司); 低温高速离心机(德国 Heraeus 公司); 倒置显微镜和光学显微镜(日本 Olympus 公司); 酶联免疫检测仪器(华东电子集团医疗装备有限公司); PCR 扩增仪(美国 ABI 公司); 流式细胞仪(美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

CCL229 细胞和 HIEC 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和 1% 链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。

2.2 青蒿琥酯对 CCL229 细胞存活率的影响

取处于对数生长期的 CCL229 细胞, 以 2×10^4 /孔接种于 96 孔板中, 100 μ L/孔, 设置对照组、青蒿琥酯(5、10、20、40 μ g/mL) 组和 5-氟尿嘧啶(40 μ g/mL) 组, 待细胞贴壁后, 各给药组加入 100 μ L 相应药物, 对照组加入不含药物的培养基, 分别培养 24、48、72 h, 加入 20 μ L MTT (5 mg/mL) 溶液, 37 °C 孵育 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 采用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度(A) 值, 计算细胞存活率。

2.3 青蒿琥酯对 CCL229 细胞凋亡的影响

取处于对数生长期的 CCL229 细胞, 以 1×10^5 /mL 接种于 6 孔板中, 2 mL/孔, 设置对照组、青蒿琥酯(20 μ g/mL) 组和 5-氟尿嘧啶(40 μ g/mL) 组, 待细胞贴壁后, 各给药组加入相应药物, 对照

组加入不含药物的培养基, 培养 24 h。收集细胞, 1000 $\times g$ 离心 5 min 后弃上清, PBS 冲洗 3 次后重悬细胞, 加入 1 mL 70% 预冷乙醇溶液固定细胞; 加入 PBS 离心沉淀去除固定液, 加入 100 μ L RNA 消化酶(100 μ g/mL), 37 °C 水浴 30 min, 加入 100 μ L 碘化丙啶(PI, 50 μ g/mL) 染色液, 4 °C 避光染色 30 min 后, 采用流式细胞仪进行检测。

2.4 青蒿琥酯对 CCL229 细胞侵袭能力的影响

将 Matrigel 和无血清 RPMI 1640 培养基按 1:1 配制成细胞外基质胶, Transwell 小室中加入 30 μ L 细胞外基质胶。按“2.3”项下方法处理细胞, 收集细胞, 以无血清 RPMI 1640 培养基重悬, 在 Transwell 小室的上室中加入 200 μ L 细胞悬液, 下室中加入 600 μ L 含 FBS 的 RPMI 1640 培养基, 培养 24 h。擦除小室滤膜内表面细胞, 于 4% 多聚甲醛中固定, PBS 冲洗 3 次后使用 0.1% 结晶紫染色, 于显微镜下对穿过膜的细胞进行计数。

2.5 青蒿琥酯对 CCL229 细胞克隆形成的影响

按“2.3”项下方法处理细胞, 收集细胞, 台盼蓝染色后对活细胞进行计数。将细胞接种于 6 孔板, 加入 3 mL 含 FBS 的 RPMI 1640 培养基, 隔天更换培养基, 于恒温培养箱中培养 7 d 后对各组集落数目进行计数。

2.6 青蒿琥酯对 CCL229 细胞自噬特异性蛋白及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白表达的影响

按“2.3”项下方法处理细胞, 收集细胞, 加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白质量浓度, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶, 于室温封闭 1 h, 分别加入 Beclin1、LC3-I/II、Atg5、Atg12、ZO-1、E-cadherin、N-cadherin、Slug、 β -actin 抗体(1:2000), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次后加入 HRP 标记的 IgG 抗体(1:10 000), 于室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后使用 ECL 发光试剂盒显影, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.7 CCL229 细胞和 HIEC 细胞中 miR-21 mRNA 表达

设置 CCL229 组、HIEC 组和青蒿琥酯(20 μ g/mL) 组, HIEC 组加入 HIEC 细胞, 其余各组加入 CCL229 细胞, 以 1×10^5 /mL 接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 青蒿琥酯组加入药物, 培养 24 h。收集细胞, 按照试剂盒说明书提取 RNA 并合成

cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列: *miR-21* 上游引物 5'-ACACTCCAGCTGGGTAGCTTATCAG-ACTGA-3', 下游引物 5'-TGGTGTCGTGGAGTCG-3'; *U6* 上游引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 下游引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

2.8 过表达或抑制 *miR-21* 对 CCL229 细胞 *miR-21* mRNA 表达的影响

设置对照组、*miR-21* 过表达阴性对照组 (*miR-NC mimics*)、*miR-21* 过表达组 (*miR mimics*)、*miR-21* 抑制阴性对照组 (*miR-NC inhibitor*)、*miR-21* 抑制组 (*miR inhibitor*)。按照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书将 *miR-NC mimics*、*miR-21 mimics* (*miR mimics*)、*miR-NC inhibitor*、*miR-21 inhibitor* (*miR inhibitor*) 转染至 CCL229 细胞内, 48 h 后, 按“2.7”项下方法检测 CCL229 细胞中 *miR-21* mRNA 表达情况。*miR mimics* 序列: 5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'; *miR inhibitor* 序列: 5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'。

2.9 过表达或抑制 *miR-21* 对青蒿琥酯促 CCL229 细胞凋亡的影响

设置对照组、*miR-21* 过表达组 (*miR mimics*)、*miR-21* 抑制组 (*miR inhibitor*)。按“2.8”项下方法进行转染, 转染 48 h 后, 各组加入青蒿琥酯 (20 $\mu\text{g/mL}$), 继续培养 24 h, 按“2.3”项下方法检测细胞凋亡情况。

2.10 过表达或抑制 *miR-21* 对青蒿琥酯抑制 CCL229 细胞侵袭能力的影响

按“2.9”项下方法处理细胞, 按“2.4”项下方法检测细胞侵袭情况。

2.11 过表达或抑制 *miR-21* 对青蒿琥酯抑制 CCL229 细胞克隆形成的影响

按“2.9”项下方法处理细胞, 按“2.5”项下方法检测细胞克隆形成情况。

2.12 过表达或抑制 *miR-21* 对青蒿琥酯调控 CCL229 细胞自噬特异性蛋白及上皮间质转化相关蛋白表达的影响

按“2.9”项下方法处理细胞, 按“2.6”项下方法检测自噬特异性蛋白及上皮间质转化相关蛋白表达情况。

2.13 双荧光素酶报告基因实验验证 *miR-21* 与 *PTEN* 靶向关系

将 *miR-21* 和 *PTEN* 的 3'-UTR 靶序列插入到萤火虫荧光素酶基因下游。将 *miR-NC mimics*、*miR*

mimics 载体与 *WT-PTEN*、*MUT-PTEN* 载体分别共转染到 CCL229 细胞内, 于培养箱中培养 8 h, 弃上清, 加入 0.5 mL 含 10% 胎牛血清、无抗生素的 DMEM 培养基, 于培养箱中培养 48 h, 收集细胞。按照双荧光素酶报告基因试剂盒说明书检测荧光素酶, 采用酶标仪检测萤火虫和海肾荧光值, 并以海肾荧光值作为内参。

2.14 过表达或抑制 *miR-21* 对 CCL229 细胞 *PTEN* 蛋白表达的影响

设置对照组、*miR-21* 过表达组 (*miR mimics*)、*miR-21* 抑制剂组 (*miR inhibitor*)。按“2.8”项下方法进行转染, 按“2.6”项下方法检测细胞中 *PTEN* 蛋白表达情况。

2.15 CCL229 细胞和 HIEC 细胞中 *PTEN* 蛋白表达

按“2.7”项下方法处理细胞, 按“2.6”项下方法检测细胞中 *PTEN* 蛋白表达情况。

2.16 过表达或抑制 *PTEN* 对 CCL229 细胞 *PTEN* 蛋白表达的影响

设置对照组、*PTEN* 过表达阴性对照组 (*pc-NC*)、*PTEN* 过表达组 (*pc-PTEN*)、*PTEN* 抑制阴性对照组 (*si-NC*)、*PTEN* 抑制组 (*si-PTEN*) 和 *PTEN* 过表达联合 *miR-21* 过表达组 (*pc-PTEN+miR mimics*), 按“2.8”项下方法进行转染, 按“2.6”项下方法检测 CCL229 细胞中 *PTEN* 蛋白表达情况。*si-PTEN* 序列为: 5'-GACGGGAAGACAAGUUCAUTT-3'。

2.17 过表达或抑制 *PTEN* 对青蒿琥酯降低 CCL229 细胞存活率的影响

设置对照组、*PTEN* 过表达组 (*pc-PTEN*)、*PTEN* 抑制组 (*si-PTEN*) 和 *PTEN* 过表达联合 *miR-21* 过表达组 (*pc-PTEN+miR mimics*), 按“2.8”项下方法进行转染, 各组加入青蒿琥酯 (20 $\mu\text{g/mL}$), 培养 24 h, 按“2.2”项下方法检测细胞存活率。

2.18 过表达或抑制 *PTEN* 对青蒿琥酯促 CCL229 细胞凋亡的影响

按“2.17”项下方法处理细胞, 按“2.3”项下方法检测细胞凋亡情况。

2.19 过表达或抑制 *PTEN* 对青蒿琥酯抑制 CCL229 细胞侵袭能力的影响

按“2.17”项下方法处理细胞, 按“2.4”项下方法检测细胞侵袭情况。

2.20 过表达或抑制 *PTEN* 对青蒿琥酯抑制 CCL229 细胞克隆形成的影响

按“2.17”项下方法处理细胞, 按“2.5”项下

方法检测细胞克隆形成情况。

2.21 过表达或抑制 *PTEN* 对青蒿琥酯调控 CCL229 细胞自噬特异性蛋白及上皮间质转化相关蛋白表达的影响

按“2.17”项下方法处理细胞，按“2.6”项下方法检测自噬特异性蛋白及上皮间质转化相关蛋白表达情况。

2.22 统计分析

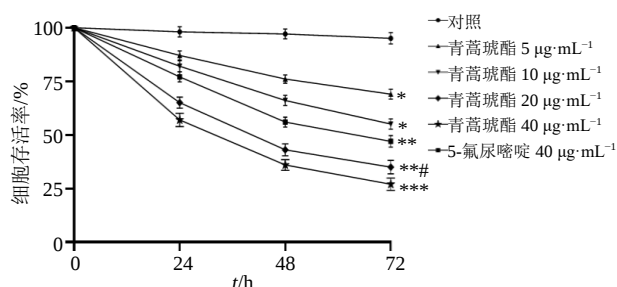
采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，运用 GraphPad Prism 8.2 绘制统计图，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 青蒿琥酯对 CCL229 细胞存活率、凋亡、侵袭及克隆形成的影响

如图 1 所示，青蒿琥酯（5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ ）作用 24、48、72 h 均可显著抑制 CCL229 细胞存活率（ $P < 0.05$ 、0.01、0.001），呈剂量和时间相关性；与 5-氟尿嘧啶组比较，青蒿琥酯（20 $\mu\text{g/mL}$ ）可显著抑制 CCL229 细胞活力（ $P < 0.05$ ），因此选择 20 $\mu\text{g/mL}$ 青蒿琥酯进行后续实验。

如图 2-A 所示，与对照组比较，青蒿琥酯组细胞凋亡率显著升高（ $P < 0.001$ ），优于 5-氟尿嘧啶。如图 2-B 所示，与对照组比较，青蒿琥酯组细胞侵袭能力显著降低（ $P < 0.001$ ），优于 5-氟尿嘧啶；如图 2-C 所示，与对照组比较，青蒿琥酯组细胞克隆形成能力显著降低（ $P < 0.001$ ），优于 5-氟尿嘧啶。

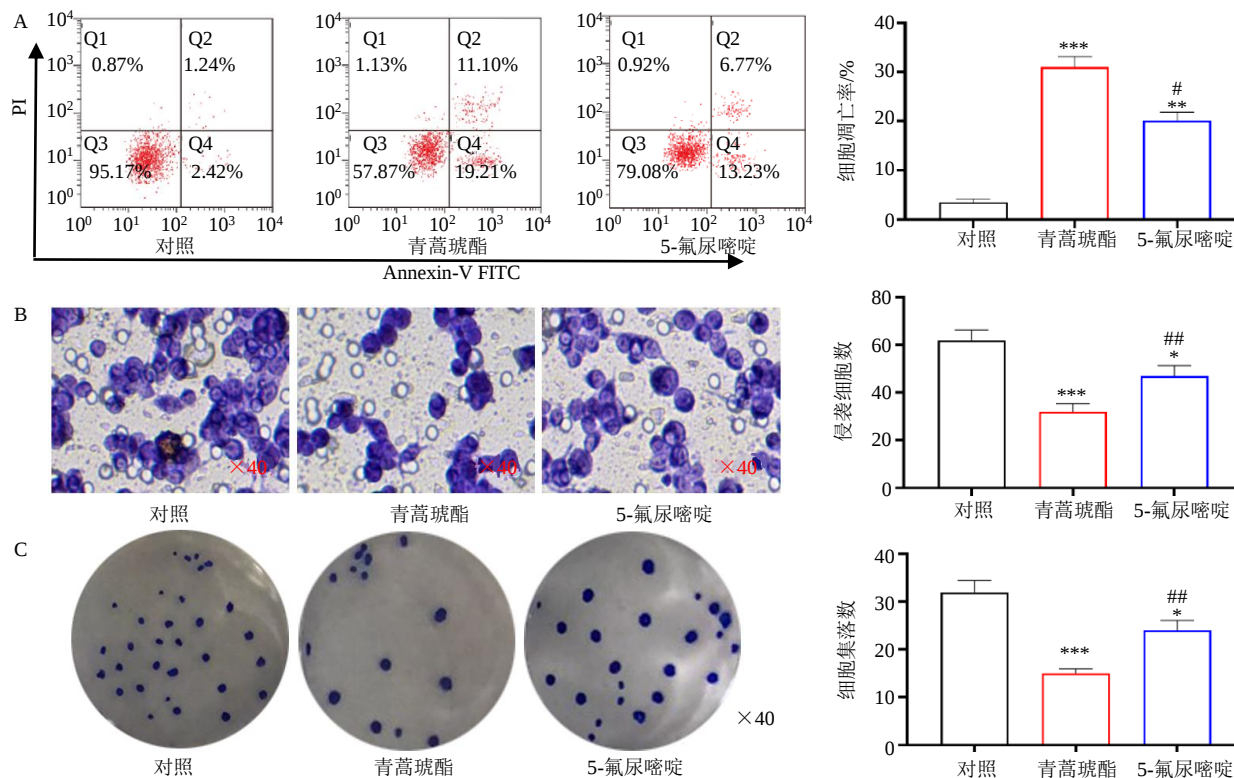


与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ；与 5-氟尿嘧啶组比较：* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 5-fluorouracil group

图 1 青蒿琥酯对 CCL229 细胞存活率的影响（ $\bar{x} \pm s, n = 3$ ）

Fig. 1 Effect of artesunate on survival rate of CCL229 cells（ $\bar{x} \pm s, n = 3$ ）



与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ；与青蒿琥酯组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs artesunate group

图 2 青蒿琥酯对 CCL229 细胞凋亡 (A)、侵袭 (B) 及克隆形成能力 (C) 的影响（ $\bar{x} \pm s, n = 3$ ）

Fig. 2 Effect of artesunate on apoptosis (A), invasion (B) and clonal formation (C) of CCL229 cells（ $\bar{x} \pm s, n = 3$ ）

如图 3 所示,与对照组比较,青蒿琥酯组 CCL229 细胞内自噬特异性蛋白 Atg5-Atg12 复合物、Atg5、Beclin1 和 LC3-I/II 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), EMT 相关蛋白 ZO-1、E-cadherin 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), N-cadherin 和 Slug 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.2 miR-21 在 CCL229 细胞内的表达及作用

如图 4-A 所示,与 CCL229 细胞比较, HIEC 细胞内 miR-21 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 青蒿琥酯组 CCL229 细胞内 miR-21 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。如图 4-B 所示, 转染 miR-21 过表达载体或 miR-21 抑制载体至 CCL229 细胞内, CCL229 细胞内 miR-21 mRNA 表达水平显

著升高或降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

如图 5-A 所示,过表达 miR-21 显著抑制青蒿琥酯对 CCL229 细胞的促凋亡作用 ($P < 0.001$), 抑制 miR-21 显著增强青蒿琥酯对 CCL229 细胞的促凋亡作用 ($P < 0.01$)。如图 5-B 所示, 过表达 miR-21 显著减弱青蒿琥酯对 CCL229 细胞侵袭能力的抑制作用 ($P < 0.01$), 抑制 miR-21 显著增强青蒿琥酯对 CCL229 细胞侵袭能力的抑制作用 ($P < 0.05$)。如图 5-C 所示, 过表达 miR-21 显著减弱青蒿琥酯对 CCL229 细胞克隆形成能力的抑制作用 ($P < 0.01$), 抑制 miR-21 显著增强青蒿琥酯对 CCL229 细胞克隆形成能力的抑制作用 ($P < 0.05$)。

如图 6 所示, 过表达 miR-21 显著抑制青蒿琥

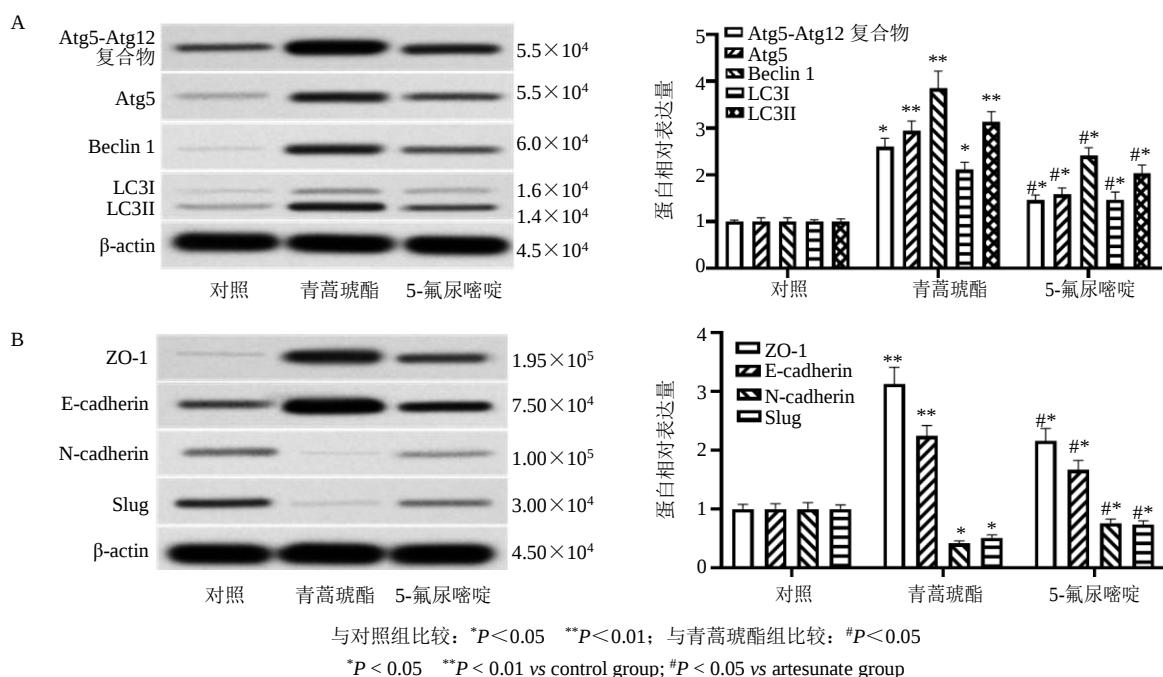
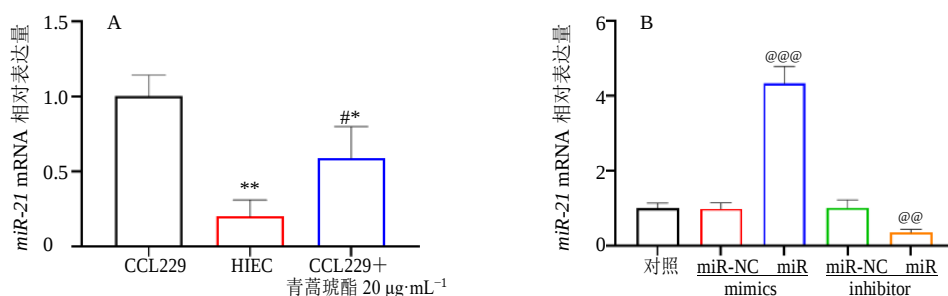


图 3 青蒿琥酯对 CCL229 细胞中自噬相关蛋白 (A) 及 EMT 相关蛋白 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of artesunate on autophagy-related proteins (A) and EMT-related proteins (B) in CCL229 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与 CCL229 细胞比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 HIEC 细胞比较: # $P < 0.05$; 与对照组比较: @ $P < 0.01$ @@@ $P < 0.001$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs CCL229 cells; # $P < 0.05$ vs HIEC cells; @ $P < 0.01$ @@@ $P < 0.001$ vs control group

图 4 CCL229 细胞 miR-21 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Expression of miR-21 in CCL229 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

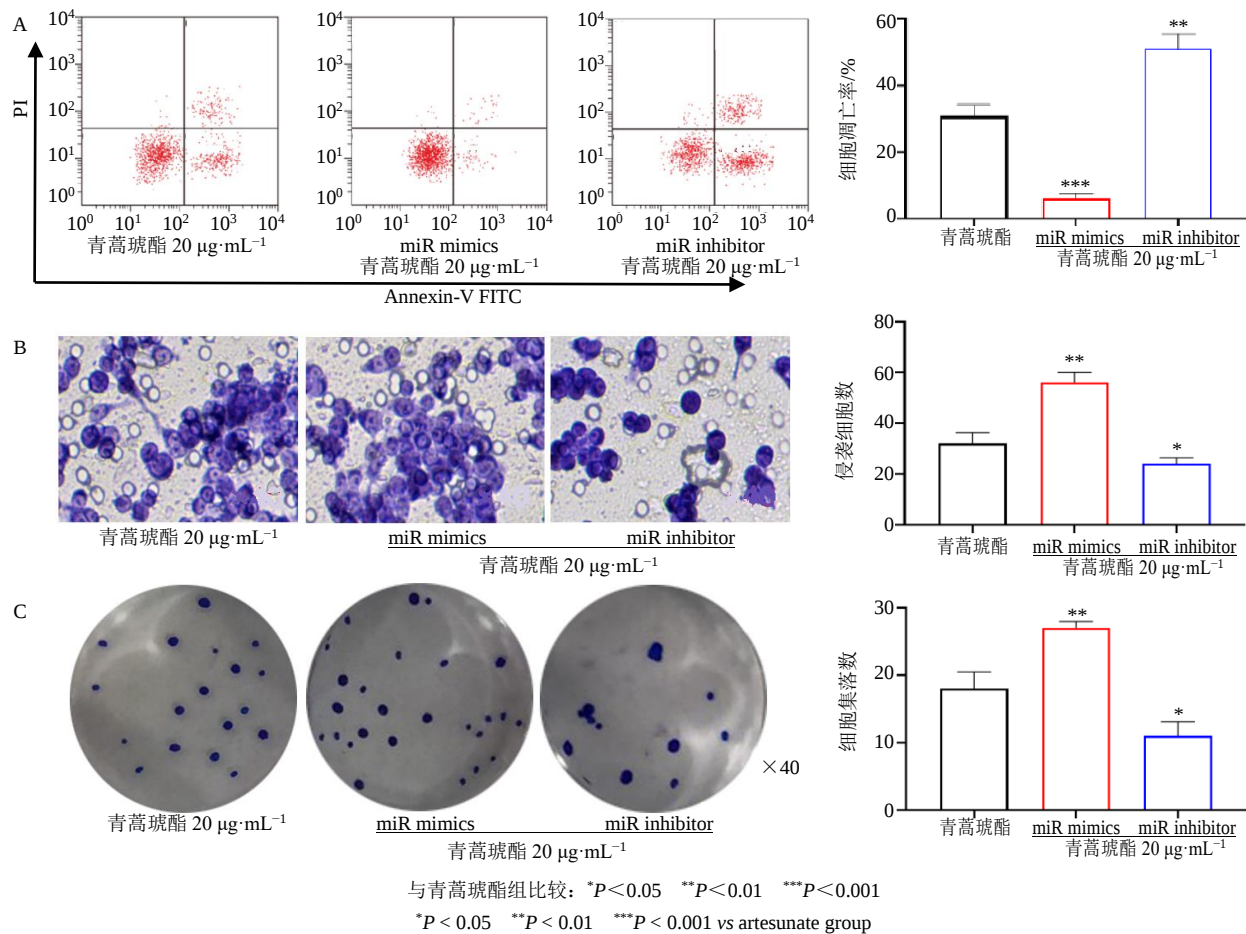


图 5 *miR-21* 对 CCL229 细胞凋亡 (A)、侵袭 (B) 及克隆形成能力 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of *miR-21* on apoptosis (A), invasion (B) and clonal formation (C) of CCL229 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

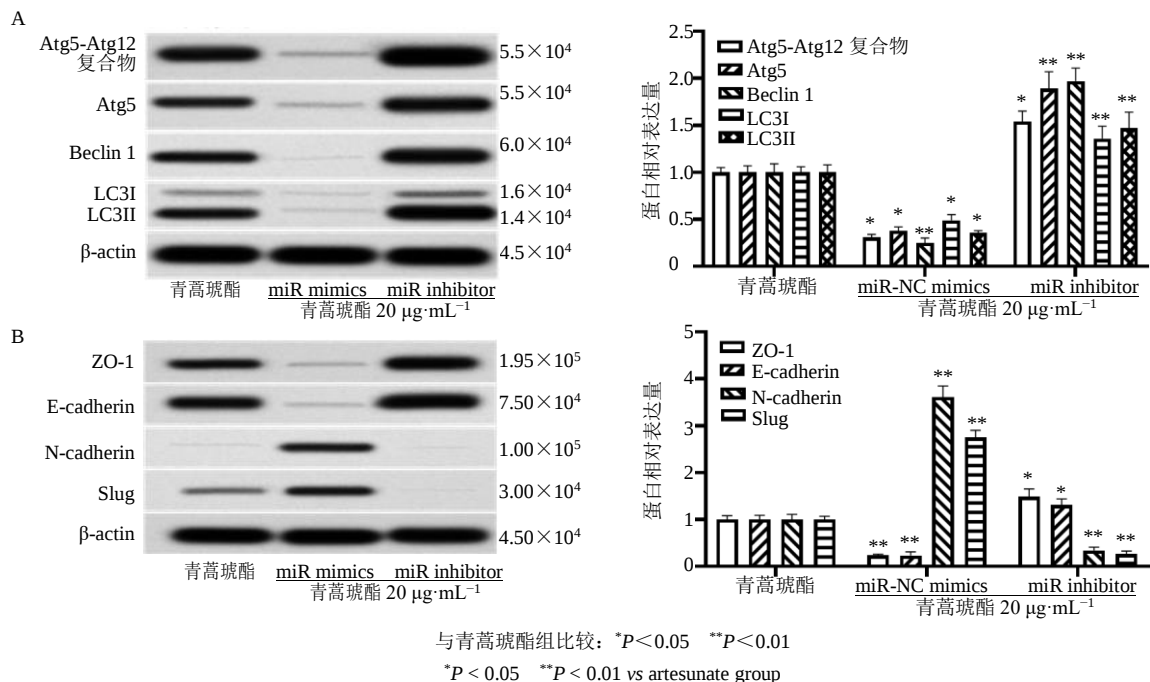


图 6 *miR-21* 对 CCL229 细胞中自噬相关蛋白 (A) 及 EMT 相关蛋白 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of *miR-21* on expression of autophagy-related protein (A) and EMT-related protein (B) in CCL229 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

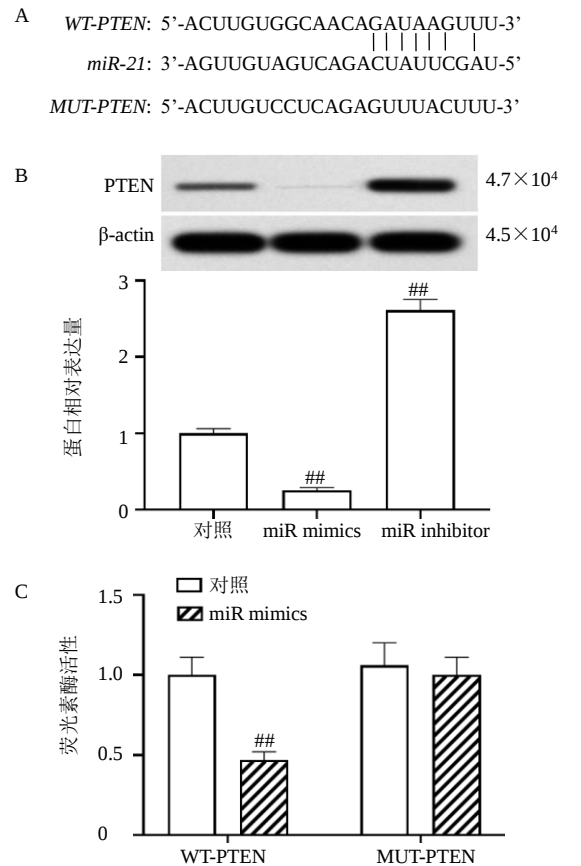
酯对 CCL229 细胞自噬特异性蛋白 Atg5-Atg12 复合物、Atg5、Beclin1、LC3-I/II 以及 EMT 相关蛋白 ZO-1、E-cadherin 表达水平的上调作用 ($P < 0.05$ 、 0.01)，显著抑制青蒿琥酯对 CCL229 细胞 N-cadherin 和 Slug 蛋白表达水平的下调作用 ($P < 0.01$)；抑制 *miR-21* 显著增强青蒿琥酯对 CCL229 细胞自噬特异性蛋白 Atg5-Atg12 复合物、Atg5、Beclin1、LC3-I/II 以及 EMT 相关蛋白 ZO-1、E-cadherin 表达水平的上调作用 ($P < 0.05$ 、 0.01)，显著增强青蒿琥酯对 CCL229 细胞 N-cadherin 和 Slug 蛋白表达水平的下调作用 ($P < 0.01$)。

3.3 PTEN 为 *miR-21* 的下游靶基因

生物信息学网站 (ENCORI) 预测结果如图 7-A 所示，*miR-21* 与 *PTEN* mRNA 3'-UTR 端存在部分靶向结合序列。如图 7-B 所示，过表达 *miR-21* 显著抑制 CCL229 细胞内 PTEN 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)，抑制 *miR-21* 表达显著上调 PTEN 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。双荧光素酶报告基因结果如图 7-C 所示，过表达 *miR-21* 显著抑制野生型 PTEN (WT-PTEN) 质粒的荧光素酶活性 ($P < 0.01$)，但对突变型 PTEN (MUT-PTEN) 质粒的荧光素酶活性无显著影响。

3.4 青蒿琥酯通过 *miR-21*/PTEN 抑制 CCL229 恶性生物学行为

如图 8-A 所示，与 CCL229 细胞比较，HIEC 细胞内 PTEN 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)，青蒿琥酯组 CCL229 细胞内 PTEN 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。如图 8-B 所示，转染 *PTEN* 过表达载体或 *PTEN* 抑制载体至 CCL229 细胞内，CCL229 细胞内 PTEN 蛋白表达水平显著升高或降低 ($P < 0.01$)。

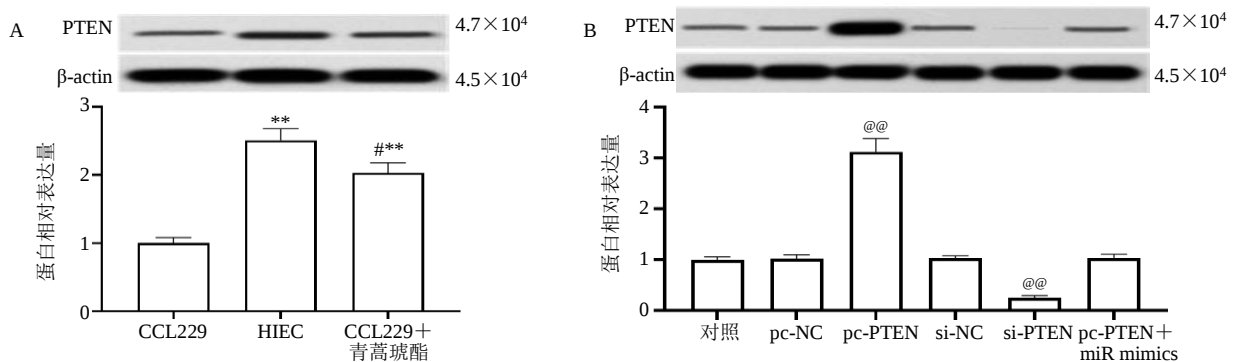


A-*miR-21* 与 *PTEN* mRNA 靶向结合位点 B-过表达或抑制 *miR-21* 对 CCL229 细胞内 PTEN 蛋白表达的影响 C-过表达 *miR-21* 对 CCL229 细胞荧光素酶活性的影响；与对照组比较：## $P < 0.01$

A-*miR-21* and *PTEN* mRNA target binding site B-Effect of overexpression or inhibition *miR-21* on PTEN protein expression in CCL229 cells C-Effect of overexpression *miR-21* on luciferase activity of CCL229 cells; ## $P < 0.01$ vs control group

图 7 *PTEN* 为 *miR-21* 的下游靶基因 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 *PTEN* was downstream target gene of *miR-21* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



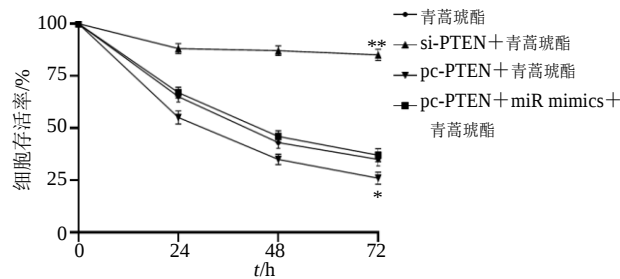
与 CCL229 细胞比较：** $P < 0.01$ ；与 HIEC 细胞比较：# $P < 0.05$ ；与对照组比较：@@ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs CCL229 cells; # $P < 0.05$ vs HIEC cells; @@ $P < 0.01$ vs control group

图 8 *PTEN* 在 CCL229 细胞内的表达 (A) 以及过表达或抑制 *PTEN* 对 *PTEN* 蛋白表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 *PTEN* expression in CCL229 cells (A), effect of overexpression or inhibition *PTEN* on PTEN protein expression (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

如图 9 所示, 过表达 *PTEN* 显著增强青蒿琥酯对 CCL229 细胞存活率的抑制作用 ($P<0.05$), 抑制 *PTEN* 显著减弱青蒿琥酯对 CCL229 细胞存活率的抑制作用 ($P<0.01$)。



与青蒿琥酯组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs artesunate group

图 9 青蒿琥酯通过 miR-21/PTEN 调控 CCL229 细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Artesunate regulated survival rate of CCL229 cells through miR-21/PTEN ($\bar{x} \pm s, n=3$)

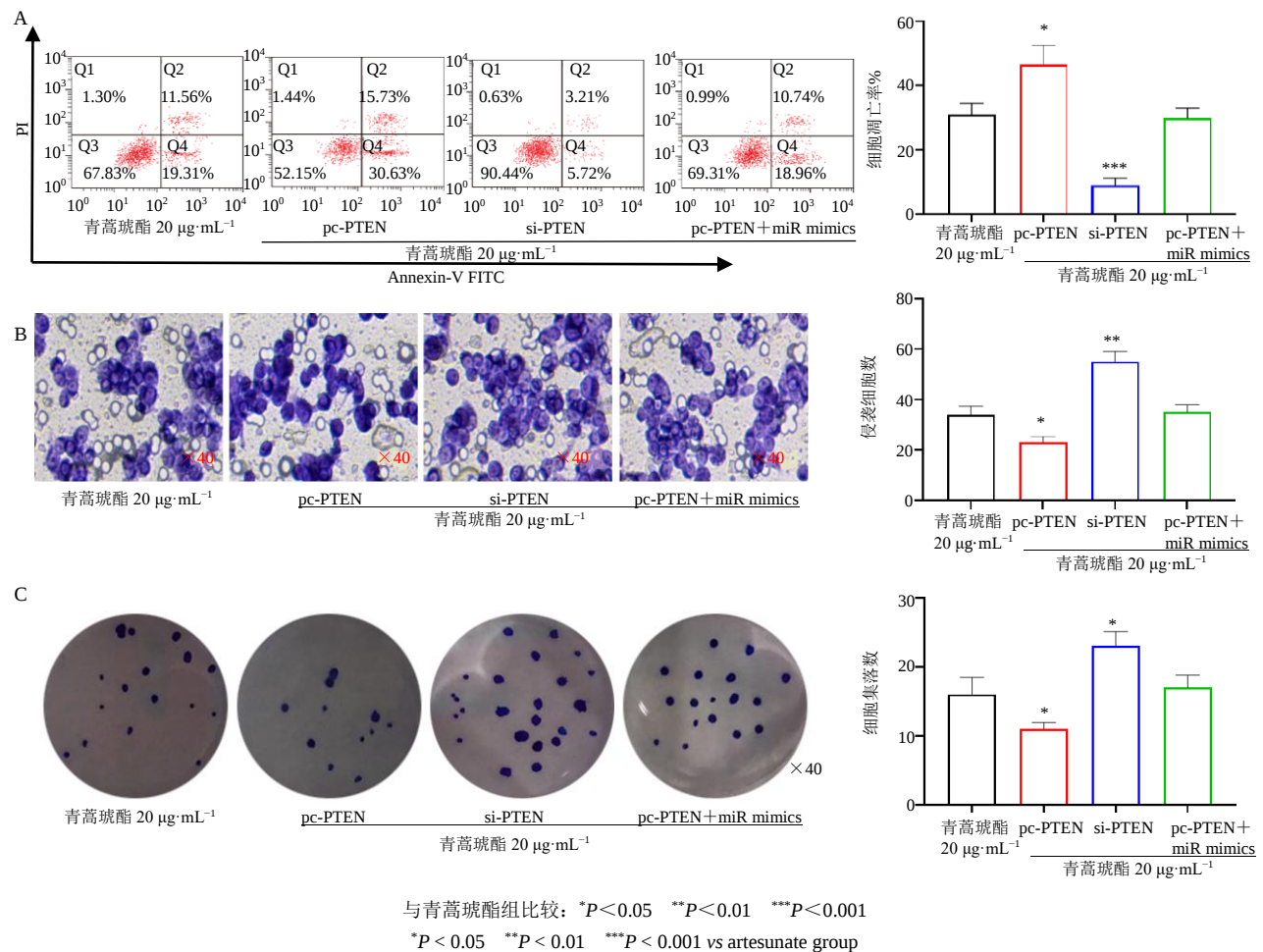


图 10 青蒿琥酯通过 miR-21/PTEN 影响 CCL229 细胞凋亡 (A)、侵袭 (B) 及克隆形成能力 (C) ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 10 Artesunate affected apoptosis (A), invasion (B) and clonal formation (C) of CCL229 cells through miR-21/PTEN ($\bar{x} \pm s, n=3$)

如图 10-A 所示, 过表达 *PTEN* 显著增强青蒿琥酯对 CCL229 细胞的促凋亡作用 ($P<0.05$), 抑制 *PTEN* 显著减弱青蒿琥酯对 CCL229 细胞的促凋亡作用 ($P<0.001$)。如图 10-B 所示, 过表达 *PTEN* 显著增强青蒿琥酯对 CCL229 细胞侵袭能力的抑制作用 ($P<0.05$), 抑制 *PTEN* 显著减弱青蒿琥酯对 CCL229 细胞侵袭能力的抑制作用 ($P<0.01$)。如图 10-C 所示, 过表达 *PTEN* 显著减弱青蒿琥酯对 CCL229 细胞克隆形成能力的抑制作用 ($P<0.05$), 抑制 *PTEN* 显著减弱青蒿琥酯对 CCL229 细胞克隆形成能力的抑制作用 ($P<0.05$)。

如图 11 所示, 过表达 *PTEN* 显著增强青蒿琥酯对 CCL229 细胞自噬特异性蛋白 Atg5-Atg12 复合物、Atg5、Beclin1、LC3-I/II 以及 EMT 相关蛋白 ZO-1、E-cadherin 表达水平的上调作用 ($P<0.05$ 、 0.01), 显著增强青蒿琥酯对 CCL229 细胞 N-cadherin

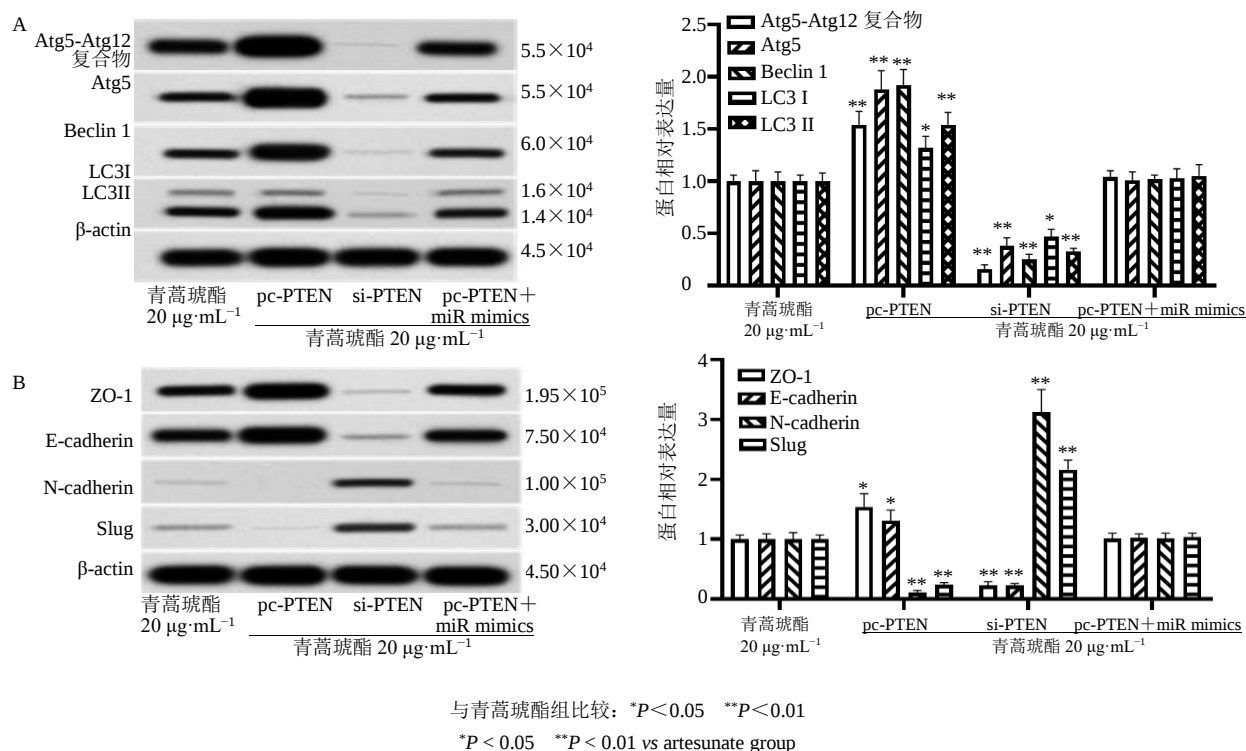


图 11 青蒿琥酯通过 miR-21/PTEN 调控 CCL229 细胞自噬 (A) 和上皮间质转化 (B) 相关蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 11 Artesunate regulated expressions of autophagy (A) and EMT (B) related protein in CCL229 cells through miR-21/PTEN ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

和 Slug 蛋白表达水平的下调作用 ($P < 0.01$)；抑制 PTEN 显著抑制青蒿琥酯对 CCL229 细胞自噬特异性蛋白 Atg5-Atg12 复合物、Atg5、Beclin1、LC3-I/II 以及 EMT 相关蛋白 ZO-1、E-cadherin 表达水平的上调作用 ($P < 0.05$ 、 0.01)，显著抑制青蒿琥酯对 CCL229 细胞 N-cadherin 和 Slug 蛋白表达水平的下调作用 ($P < 0.01$)。

此外，同时过表达 miR-21 和 PTEN 对青蒿琥酯抑制 CCL229 细胞的恶性生物学行为无显著影响。

4 讨论

青蒿素及其衍生物如蒿甲醚、青蒿琥酯、双氢青蒿素等具有抗疟疾、免疫调节、抗肿瘤等作用^[15-17]。Efferth 等^[10]发现青蒿琥酯对白血病细胞和大肠癌细胞株表现出明显的抑制作用，对黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、神经系统肿瘤也有一定程度的抑制作用。本研究结果显示，青蒿琥酯可抑制 CCL229 细胞存活率，且呈剂量和时间相关性；青蒿琥酯可促进 CCL229 细胞凋亡，抑制 CCL229 细胞侵袭和克隆形成能力。大肠癌的复发与转移是影响患者术后生存率的主要因素^[18]。大肠癌的转移是多步骤、多因素共同导致的结果，其中

EMT 发挥重要的作用^[19]。EMT 的发生涉及多个环节，包括细胞因子和转录因子表达上调、上皮标志物下调、间质标志物上调等^[20]。EMT 是多种癌症侵袭和早期转移的一个重要过程^[21]，本研究结果显示，青蒿琥酯显著上调 CCL229 细胞内 ZO-1 和 E-cadherin 蛋白表达水平，显著下调 N-cadherin 和 Slug 蛋白表达水平，表明青蒿琥酯能抑制 CCL229 细胞侵袭，与 Transwell 实验结果一致。自噬过程是一种细胞内的降解系统，可将细胞质成分递送至溶酶体并参与自噬体的形成，在细胞的发育及对外界刺激的响应中极为重要^[22]。自噬过程在乳腺癌^[23]、口腔癌^[24]、大肠癌^[25]等肿瘤的发生和发展中具有重要作用，本研究结果显示，青蒿琥酯显著上调 CCL229 细胞内 Beclin1、LC3-I/II、Atg5 和 Atg5-Atg12 复合物蛋白表达水平，表明青蒿琥酯能够诱导 CCL229 细胞发生自噬。此外，本研究发现 20 μg/mL 青蒿琥酯对 CCL229 细胞恶性生物学行为的抑制作用优于 40 μg/mL 5-氟尿嘧啶。与化疗药物 5-氟尿嘧啶相比，青蒿琥酯不会直接杀伤癌细胞，主要通过诱导癌细胞凋亡从而抑制癌细胞的恶性生物学行为。

研究发现,多种 *miRNA* 在大肠癌细胞株和组织中异常表达,如 *miR-19a*、*miR-21*、*miR-29a*、*miR-92* 等在大肠癌组织中呈高表达水平, *miR-30c*、*miR-133a*、*miR-145* 等在大肠癌组织中呈低表达水平^[26]。本研究结果显示,相较于 HIEC 细胞, *miR-21* mRNA 在 CCL229 细胞中表达显著上调,过表达 *miR-21* 后 CCL229 细胞对青蒿琥酯的敏感性显著降低,抑制 *miR-21* 后 CCL229 细胞对青蒿琥酯的敏感性显著增加,表明 *miR-21* 参与了 CCL229 细胞的增殖、凋亡、侵袭及 EMT 等过程,青蒿琥酯可能通过下调 *miR-21* 表达,从而抑制 CCL229 细胞恶性生物学行为。

PTEN 是重要的肿瘤抑制基因,PTEN 的缺失可能会导致癌症干细胞的恶性增殖或正常干细胞分化能力的丢失^[27],本研究发现 PTEN 蛋白在 CCL229 细胞中异常下调,过表达 PTEN 可显著增强 CCL229 细胞对青蒿琥酯的敏感性,抑制 PTEN 可显著抑制 CCL229 细胞对青蒿琥酯的敏感性,表明大肠癌的发生可能与 PTEN 表达的缺失具有一定的相关性。Jiang 等^[28]发现 *miR-200a* 可通过影响 PTEN 表达促进卵巢癌细胞的增殖和侵袭;Lin 等^[29]发现 lncRNA DUXAP8 通过负调控 PTEN 表达促进膀胱癌细胞增殖。本研究通过生物信息学网站预测 *miR-21* 的下游靶基因,结果显示,PTEN 是 *miR-21* 的下游靶基因,且过表达 *miR-21* 会显著抑制 PTEN 蛋白在 CCL229 细胞内的表达。此外,将 *miR-21* 过表达载体与 PTEN 过表达载体共转染至 CCL229 细胞内,并不会对青蒿琥酯的敏感性产生显著影响,表明青蒿琥酯可能通过作用于 *miR-21*/PTEN,从而抑制 CCL229 细胞的恶性生物学行为。

综上,青蒿琥酯通过调控 *miR-21* 和 PTEN 的表达,从而诱导细胞发生凋亡和自噬,并抑制细胞的增殖和侵袭。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Greathouse K L, White J R, Padgett R N, et al. Gut microbiome meta-analysis reveals dysbiosis is independent of body mass index in predicting risk of obesity-associated CRC [J]. *BMJ Open Gastroenterol*, 2019, 6(1): e000247.
- [2] Marks K M, West N P, Morris E, et al. Clinicopathological, genomic and immunological factors in colorectal cancer prognosis [J]. *Br J Surg*, 2018, 105(2): 99-109.
- [3] Fang L, Jiang Y, Yang Y X, et al. Determining the optimal 5-FU therapeutic dosage in the treatment of colorectal cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49): 81880-81887.
- [4] Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6249.
- [5] Zhou X, Lu Z P, Wang T S, et al. Plasma miRNAs in diagnosis and prognosis of pancreatic cancer: A miRNA expression analysis [J]. *Gene*, 2018, 673: 181-193.
- [6] Wasik M A. Distinct miRNA profile in prognosis of early CTCL [J]. *Blood*, 2018, 131(7): 711.
- [7] Hao J P, Ma A. The ratio of *miR-21*/*miR-24* as a promising diagnostic and poor prognosis biomarker in colorectal cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(24): 8649-8656.
- [8] Ding T, Cui P P, Zhou Y, et al. Antisense oligonucleotides against *miR-21* inhibit the growth and metastasis of colorectal carcinoma via the DUSP8 pathway [J]. *Mol Ther-Nucl Acids*, 2018, 13: 244-255.
- [9] Adebayo J O, Tijjani H, Adegunloye A P, et al. Enhancing the antimalarial activity of artesunate [J]. *Parasitol Res*, 2020, 119(9): 2749-2764.
- [10] Efferth T, Rücker G, Falkenberg M, et al. Detection of apoptosis in KG-1a leukemic cells treated with investigational drugs [J]. *Arzneimittelforsch*, 1996, 46(2): 196-200.
- [11] Papanikolaou X, Johnson S, Garg T, et al. Artesunate overcomes drug resistance in multiple myeloma by inducing mitochondrial stress and non-caspase apoptosis [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(12): 4118-4128.
- [12] Trimble C L, Levinson K, Maldonado L, et al. A first-in-human proof-of-concept trial of intravaginal artesunate to treat cervical intraepithelial neoplasia 2/3 (CIN2/3) [J]. *Gynecol Oncol*, 2020, 157(1): 188-194.
- [13] Pirali M, Taheri M, Zarei S, et al. Artesunate, as a HSP70 ATPase activity inhibitor, induces apoptosis in breast cancer cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164: 3369-3375.
- [14] Wang Z Z, Wang C, Wu Z Y, et al. Artesunate suppresses the growth of prostatic cancer cells through inhibiting androgen receptor [J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(4): 479-485.
- [15] Ji P, Wang L, Wang S Q, et al. Hyaluronic acid-coated metal-organic frameworks benefit the ROS-mediated apoptosis and amplified anticancer activity of artesunate [J]. *J Drug Target*, 2020, 28(10): 1096-1109.
- [16] Hamoya T, Fujii G, Iizumi Y, et al. Artesunate inhibits

- intestinal tumorigenesis through inhibiting wnt signaling [J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42(1): 148-158.
- [17] 费伟东, 叶铁青, 陈玥, 等. 双氢青蒿素诱导肿瘤细胞铁死亡及其机制研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(13): 3473-3481.
- [18] Qi L, Song F Y, Ding Y Q. Regulatory mechanism of ITGBL1 in the metastasis of colorectal cancer [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 259.
- [19] Li Q Y, Lai Q H, He C C, *et al.* RUNX1 promotes tumour metastasis by activating the Wnt/ β -catenin signalling pathway and EMT in colorectal cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 334.
- [20] Siraj A K, Pratheeshkumar P, Divya S P, *et al.* TGF β -induced SMAD4-dependent apoptosis proceeded by EMT in CRC [J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(7): 1312-1322.
- [21] Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression [J]. *J Biochem*, 2018, 164(4): 257-264.
- [22] Yan X J, Zhou R M, Ma Z Y. Autophagy-cell survival and death [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 667-696.
- [23] Ulasov I V, Borovjagin A V, Timashev P, *et al.* KISS₁ in breast cancer progression and autophagy [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38(3): 493-506.
- [24] Lin F, Gao L, Su Z Y, *et al.* Knockdown of KPNA2 inhibits autophagy in oral squamous cell carcinoma cell lines by blocking p53 nuclear translocation [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(1): 179-194.
- [25] Wang Y F, Zhang S Y, Dang S W, *et al.* Overexpression of microRNA-216a inhibits autophagy by targeting regulated MAP1S in colorectal cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 4621-4629.
- [26] 胡婷, 陈梅香, 闫雍容, 等. miR-21 在大肠癌细胞迁移和侵袭中的作用及机制探讨 [J]. *山东医药*, 2012, 52(31): 7-10.
- [27] Zhang B G, Zhang X B, Jin M, *et al.* CagA increases DNA methylation and decreases PTEN expression in human gastric cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(1): 309-319.
- [28] Jiang J H, Lv Q Y, Yi Y X, *et al.* MicroRNA-200a promotes proliferation and invasion of ovarian cancer cells by targeting PTEN [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(19): 6260-6267.
- [29] Lin M G, Hong Y K, Zhang Y, *et al.* Mechanism of lncRNA DUXAP8 in promoting proliferation of bladder cancer cells by regulating PTEN [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(11): 3370-3377.

[责任编辑 李亚楠]