

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.10.003

· 基础研究 ·

盐酸石蒜碱通过 circASH2L/miR-124-3p 轴调控肝癌 HCCLM3 细胞的恶性生物学行为

苏珊珊¹, 王怀璋², 唐玉君¹, 万家鑫³ (1. 河南中医药大学第二临床医学院 肿瘤科, 河南 郑州 450011; 2. 郑州大学附属肿瘤医院 河南省肿瘤医院 中西医结合六病区, 河南 郑州 450003; 3. 河南中医药大学第二临床医学院 肛肠科, 河南 郑州 450018)

[摘要] **目的:** 探讨盐酸石蒜碱 (lycorine hydrochloride, LH) 对肝癌 HCCLM3 细胞恶性生物学行为的影响及其对 circASH2L/miR-124-3p 轴的调控作用。**方法:** 将 HCCLM3 细胞分为不同浓度 LH 处理组 (LH-L、LH-M、LH-H 组) 和 Con、si-NC、si-circASH2L、LH+pcDNA、LH+pcDNA-circASH2L 组; 以 CCK-8 法、平板克隆形成实验、流式细胞术、细胞划痕实验和 Transwell 小室实验分别检测 HCCLM3 细胞的增殖、克隆形成、凋亡、迁移和侵袭; qPCR 法检测 HCCLM3 细胞中 circASH2L 和 miR-124-3p 的表达量; 双荧光素酶报告基因实验检测 circASH2L 和 miR-124-3p 的靶向关系; WB 法检测 cleaved-caspase3、cleaved-caspase9、E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达量。**结果:** 与 Con 组比较, LH 不同浓度组细胞增殖抑制率升高 ($P<0.05$), 凋亡率与 cleaved-caspase3、cleaved-caspase9、E-cadherin 蛋白水平升高 (均 $P<0.05$), miR-124-3p 的表达水平升高 ($P<0.05$), 克隆形成数与侵袭细胞数减少 (均 $P<0.05$), 划痕愈合率与 N-cadherin 蛋白水平降低 ($P<0.05$), circASH2L 的表达水平降低 ($P<0.05$), 且不同浓度组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。circASH2L 可负向调控 miR-124-3p。与 si-NC 组比较, si-circASH2L 组细胞增殖抑制率升高 ($P<0.05$), 凋亡率与 cleaved-caspase3、cleaved-caspase9、E-cadherin 蛋白水平升高 (均 $P<0.05$), 划痕愈合率与 N-cadherin 蛋白水平降低 (均 $P<0.05$), 克隆形成数与侵袭细胞数减少 (均 $P<0.05$)。与 LH+pcDNA 组比较, LH+pcDNA-circASH2L 组 miR-124-3p 的表达水平降低 ($P<0.05$), 细胞增殖抑制率降低 ($P<0.05$), 凋亡率与 cleaved-caspase3、cleaved-caspase9、E-cadherin 蛋白水平降低 (均 $P<0.05$), 克隆形成数与侵袭细胞数增多 (均 $P<0.05$), 划痕愈合率与 N-cadherin 蛋白水平升高 (均 $P<0.05$)。**结论:** LH 可通过调控 circASH2L/miR-124-3p 轴来抑制肝癌细胞 HCCLM3 的增殖、迁移、侵袭并诱导其凋亡。

[关键词] 盐酸石蒜碱; circASH2L; miR-124-3p; 肝癌; HCCLM3 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R730.54; R735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2021)10-0969-09

Lycorine hydrochloride regulates the malignant biological behaviors of liver cancer HCCLM3 cells through the circASH2L/miR-124-3p axis

SU Shanshan¹, WANG Huaizhang², TANG Yujun¹, WAN Jiaxin³ (1. Oncology Department, The Second Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450011, Henan, China; 2. Department of Traditional Chinese and Western Medicine, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450003, Henan, China; 3. Anorectal Department, The Second Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450018, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of lycorine hydrochloride (LH) on the malignant biological behaviors of liver cancer HCCLM3 cells and its regulation on circASH2L/miR-124-3p axis. **Methods:** HCCLM3 cells treated with different concentrations of LH were divided into LH groups with different concentrations (LH-L group, LH-M group and LH-H group), Con group, si-NC group, si-circASH2L group, LH+pcDNA group, LH+pcDNA-circASH2L group. CCK-8 assay, plate clone formation test, flow cytometry, wound-healing assay, and Transwell assay were used to detect the proliferation, clone formation, apoptosis, migration and invasion of HCCLM3 cells. qPCR was used to detect the expression levels of circASH2L and miR-124-3p in HCCLM3 cells. Dual luciferase

[基金项目] 河南省科技攻关计划资助项目 (No.162102310331); 河南省重点科技攻关计划资助项目 (No.142102310128)。Project supported by the Science and Technology Breakthrough Plan of Henan Province (No.162102310331), and the Key Science and Technology Breakthrough Plan of Henan Province (No.142102310128)

[作者简介] 苏珊珊 (1991—), 女, 硕士, 住院医师, 主要从事中医药防治恶性肿瘤相关研究, E-mail: m18530559739@163.com

[通信作者] 王怀璋 (WANG Huaizhang, corresponding author), 硕士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事中医药防治恶性肿瘤相关研究, E-mail: whz1320@126.com

reporter gene assay was used to experiment detect the targeting relationship between circASH2L and miR-124-3p. WB was used to detect the expression of cleaved-caspase3, cleaved-caspase9, E-cadherin, and N-cadherin. **Results:** Compared with the Con group, the cell proliferation inhibition rates of LH groups with different concentrations were increased ($P<0.05$), the apoptosis rates and the expression levels of cleaved-caspase3, cleaved-caspase9 and E-cadherin were increased (all $P<0.05$), the expression levels of miR-124-3p were increased ($P<0.05$), the number of clone formation and invasive cells was decreased (all $P<0.05$), the wound-healing rates and the expression levels of N-cadherin were decreased (all $P<0.05$), and the expression levels of circASH2L were decreased ($P<0.05$), and the difference among different concentration groups was statistically significant (all $P<0.05$). CircASH2L could negatively regulate miR-124-3p. Compared with the si-NC group, the cell proliferation inhibition rates of the si-circASH2L group was increased ($P<0.05$), and the apoptosis rate and the expression levels of cleaved-caspase3, cleaved-caspase9 and E-cadherin were increased (all $P<0.05$), the wound-healing rate and the expression levels of N-cadherin were decreased (all $P<0.05$), and the number of clone formation and invasive cells was decreased (all $P<0.05$). Compared with the LH+pcDNA group, the expression level of miR-124-3p in the LH+pcDNA-circASH2L group was decreased ($P<0.05$), the cell proliferation inhibition rate was decreased ($P<0.05$), the apoptosis rate and the expression levels of cleaved-caspase3, cleaved-caspase9 and E-cadherin were decreased (all $P<0.05$), the number of clone formation and invasive cells was increased ($P<0.05$), and the wound-healing rate and expression level of N-cadherin were increased (all $P<0.05$). **Conclusion:** LH can inhibit the proliferation, migration and invasion of liver cancer HCCLM3 cells and induce their apoptosis by regulating the circASH2L/miR-124-3p axis.

[Key words] lycorine hydrochloride (LH); circASH2L; miR-124-3p; liver cancer; HCCLM3 cell; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(10): 969-977. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.10.003]

肝癌是威胁人类健康的恶性肿瘤之一,具有病死率高、恶性程度高等特点,手术切除、化疗药物等方法对肝癌具有一定治疗效果,但也具有一定局限性。近年来,抗肿瘤中药成为研究重点,其具有多靶点、低毒性与疗效好等特性,越来越多的研究^[1-3]发现,中药对肝癌的发展进程具有明显的抑制作用。石蒜碱是从石蒜鳞茎中提取的一种生物碱,具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[4]。盐酸石蒜碱(lycorine hydrochloride, LH)是一种从石蒜科植物中提取的生物碱,其与肝癌等肿瘤关系的相关报道尚少。

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 在肿瘤等多种疾病发生过程中发挥重要调控作用。研究^[5]表明, circASH2L 在卵巢癌中表达上调,并可通过调节 miR-665/VEGFA 轴促进卵巢癌的发生,但其在肝癌中的表达状态及其是否可作为 LH 抗肝癌的潜在作用靶点尚未可知。生物信息学预测显示, circASH2L 与 miR-124-3p 存在结合位点, miR-124-3p 在肝癌细胞中低表达,上调其表达可通过靶向 CRKL 抑制肝癌细胞的生长和转移^[6],但 circASH2L/miR-124-3p 通路是否可作为 LH 治疗肝癌的潜在途径尚未阐明。因此,本研究主要探究 LH 是否能通过 circASH2L/miR-124-3p 轴影响肝癌细胞生物学功能,以及 circASH2L 与 miR-124-3p 的靶向关系,旨在为探寻肝癌治疗的有效药物提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 实验细胞与主要试剂

LH 购自上海源叶生物有限公司(纯度 $\geq 98\%$),肝

癌细胞 HCCLM3 购自中国科学院上海生命科学研究院。DMEM 培养基、Opti-MEM 减血清培养基与胎牛血清均购自美国 Gibco 公司, TRIzol 试剂购自北京全式金生物有限公司。逆转录与荧光定量 qPCR 试剂购自北京天根生化有限公司, LipofectamineTM2000 试剂购自美国 Invitrogen 公司, miR-NC、miR-124-3p mimic、si-NC、si-circASH2L 购自广州锐博生物有限公司, CCK-8 试剂、凋亡检测试剂盒、Transwell 小室、matrigel 基质胶购自北京索莱宝有限公司, 兔抗人 cleaved-caspase3、cleaved-caspase9、E-cadherin、N-cadherin 单克隆抗体与 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 实验分组和细胞转染

HCCLM3 细胞接种于 24 孔板(3×10^3 个/孔), 分为 LH-L、LH-M、LH-H 组, 分别加入含有不同浓度(1.2、2.4、4.8 $\mu\text{mol/L}$) LH 的培养液中培养 24 h^[7], 将正常培养(不加 LH)的 HCCLM3 细胞作为 Con 组。取 250 μl Opti-MEM 减血清培养基稀释 si-NC、si-circASH2L, 充分混匀, 室温下放置 5 min, 同时用 250 μl 的 Opti-MEM 减血清培养基稀释 LipofectamineTM2000 转染试剂并充分混匀, 将 LipofectamineTM2000 稀释工作液分别与转染序列稀释液充分混匀后室温下放置 20 min, 将其加入 HCCLM3 细胞培养液中(分别记为 si-NC 组、si-circASH2L 组), 6 h 后弃上清液, 将培养基更换为 DMEM 正常培养基, 培养 24 h。将 pcDNA、pcDNA-circASH2L 分别转染入 HCCLM3 细胞后加入含有 4.8 $\mu\text{mol/L}$ LH 的培养液培养 24 h, 分别记为

LH+pcDNA组、LH+pcDNA-circASH2L组。

1.3 CCK-8 实验检测 LH 对 HCCLM3 细胞增殖的影响

待 HCCLM3 细胞生长汇合度达到 70% 左右时用胰酶消化并制备成单细胞悬液 (2.5×10^5 个/ml), 取 100 μ l 细胞悬液接种于 96 孔板, 按照“1.2”中的分组处理细胞, 每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液 (10 mg/ml) 与 100 μ l 培养液, 于培养箱内培养 2 h, 用酶标仪检测 450 nm 波长处的光密度 (D) 值并计算细胞增殖抑制率 $[(D_{\text{对照组}} - D_{\text{实验组}})/(D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%]$ 。

1.4 平板克隆形成实验检测 LH 对 HCCLM3 细胞克隆形成的影响

取各组 HCCLM3 细胞接种于 6 孔板 (1×10^3 个/孔), 于培养箱内培养 14 d, 每 3 d 更换一次培养液, 观察细胞状态, 待细胞出现 >50 个集落终止培养, 弃培养液, 甲醛固定 30 min 后用 PBS 洗涤, 用 500 μ l 吉姆萨染色液染色, 计克隆数。

1.5 流式细胞术检测 LH 对 HCCLM3 细胞凋亡的影响

收集各组 HCCLM3 细胞后制备单细胞悬液, 加入 5 μ l Annexin V-FITC 后室温避光孵育 15 min, 加入 5 μ l PI 染色 10 min, 用 FACS Calibur 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.6 细胞划痕实验检测 LH 对 HCCLM3 细胞迁移能力的影响

收集各组 HCCLM3 细胞接种于 6 孔板 (1×10^4 个/孔), 待细胞生长汇合度达到 90% 左右, 用无菌移液枪 (200 μ l) 垂直于 6 孔板划线, PBS 洗涤, 拍照后记为 0 h, 更换为不含胎牛血清的培养基继续培养 24 h, 拍照后计算细胞迁移距离并计算划痕愈合率 $[(0 \text{ h 划痕宽度} - 24 \text{ h 划痕宽度})/0 \text{ h 划痕宽度} \times 100\%]$ 。

1.7 Transwell 实验检测 LH 对 HCCLM3 细胞侵袭能力的影响

用预涂 matrigel 基质胶的 Transwell 小室进行侵袭实验, 将各组 HCCLM3 细胞 (2.5×10^5 个/ml) 接种于上室 (200 μ l/孔), 下室加入含 10% 胎牛血清的培养液孵育 24 h, 弃小室内培养液, PBS 洗涤, 用棉签擦拭上室内侧的细胞, 用 4% 多聚甲醛固定膜下侧细胞 30 min, PBS 洗涤, 晾干后用 0.1% 结晶紫染色液染色 30 min, PBS 洗涤后晾干, 于显微镜下观察并拍照, 统计并计算侵袭细胞数。

1.8 qPCR 检测 HCCLM3 细胞中 circASH2L 和 miR-124-3p 的表达水平

用 TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA, 用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA, 以 2 μ l cDNA 进行 qPCR 反应。

按照试剂盒说明书配制反应体系: SYBR Green Master Mix 10 μ l, 正反向引物各 0.8 μ l, cDNA 2 μ l, ddH₂O 补足体系至 20 μ l; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 次循环。circASH2L 以 GAPDH 为内参, miR-124-3p 以 U6 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 circASH2L 和 miR-124-3p 相对表达量。

1.9 双荧光素酶报告基因实验检测 circASH2L 和 miR-124-3p 的靶向关系

StarBase (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 在线预测结果显示 circASH2L 和 miR-124-3p 存在结合位点, 将 circASH2L 的 miR-124-3p 结合位点序列克隆至报告基因质粒的 R-Luc 3'UTR 区构建荧光素酶报告基因质粒 WT-circASH2L, 用点突变试剂盒对结合位点进行突变并构建突变型载体 MUT-circASH2L。WT-circASH2L、MUT-circASH2L 分别与 miR-124-3p mimic 或 miR-NC 共转染入 HCCLM3 细胞, 48 h 后收集细胞并裂解细胞, 加入 F-Luc 底物检测其荧光强度, 加入 R-Luc 底物检测荧光强度, 以 R-Luc/F-Luc 荧光强度的比值表示细胞相对荧光素酶活性。

1.10 WB 法检测 cleaved-caspase3、cleaved-caspase9、E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达

收集各组 HCCLM3 细胞后加入 150 μ l 细胞裂解液裂解细胞, 对蛋白样品进行 SDS-PAGE, 将分离的蛋白条带凝胶转移至 PVDF 膜, 取 PVDF 膜置于封闭液中室温封闭 2 h, 加入 cleaved-caspase3、cleaved-caspase9、E-cadherin、N-cadherin、GAPDH 一抗 (稀释比分别为 1:800、1:800、1:600、1:600、1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 加入二抗 (稀释比为 1:2 000), 室温孵育 2 h, 用 ImageJ 软件分析各条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白相对表达量。

1.11 统计学处理

各组实验设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 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 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LH 抑制肝癌 HCCLM3 细胞的增殖

克隆形成实验和 CCK-8 实验检测结果显示, 与 Con 组比较, LH-L、LH-M、LH-H 组细胞增殖抑制率均显著升高 ($P < 0.01$), 克隆形成数显著减少 ($P < 0.01$), 且不同剂量组间比较差异亦具有统计学意义 (均 $P < 0.01$, 图 1, 表 1)。

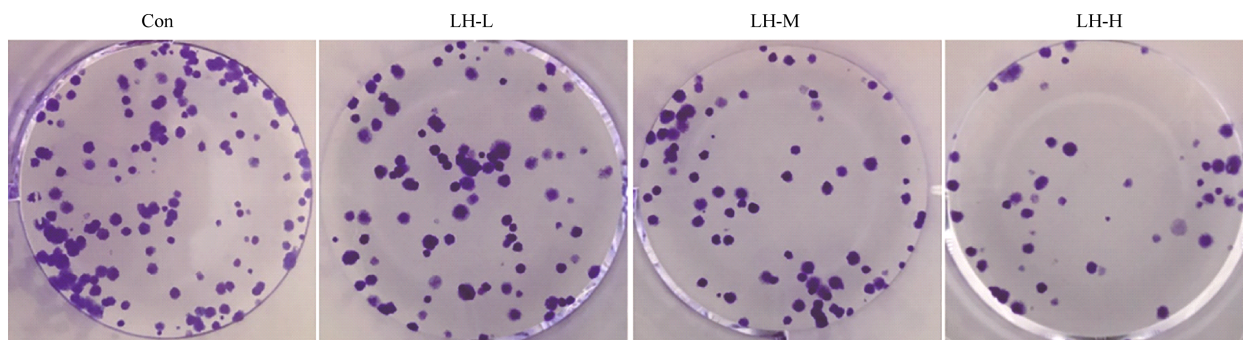


图1 LH对肝癌HCCLM3细胞克隆形成的影响

Fig.1 Effect of LH on the clone formation of liver cancer HCCLM3 cells

表1 LH对肝癌HCCLM3细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effect of LH on the proliferation of liver cancer HCCLM3 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	Inhibition rate(%)	Clone formation
Con	0.00±0.00	91.95±7.02
LH-L	21.63±2.34**	73.54±6.13**
LH-M	42.57±4.19**△△	52.24±6.70**△△
LH-H	68.85±5.67**△△△△	35.24±3.03**△△△△
F	564.287	156.280
P	0.000	0.000

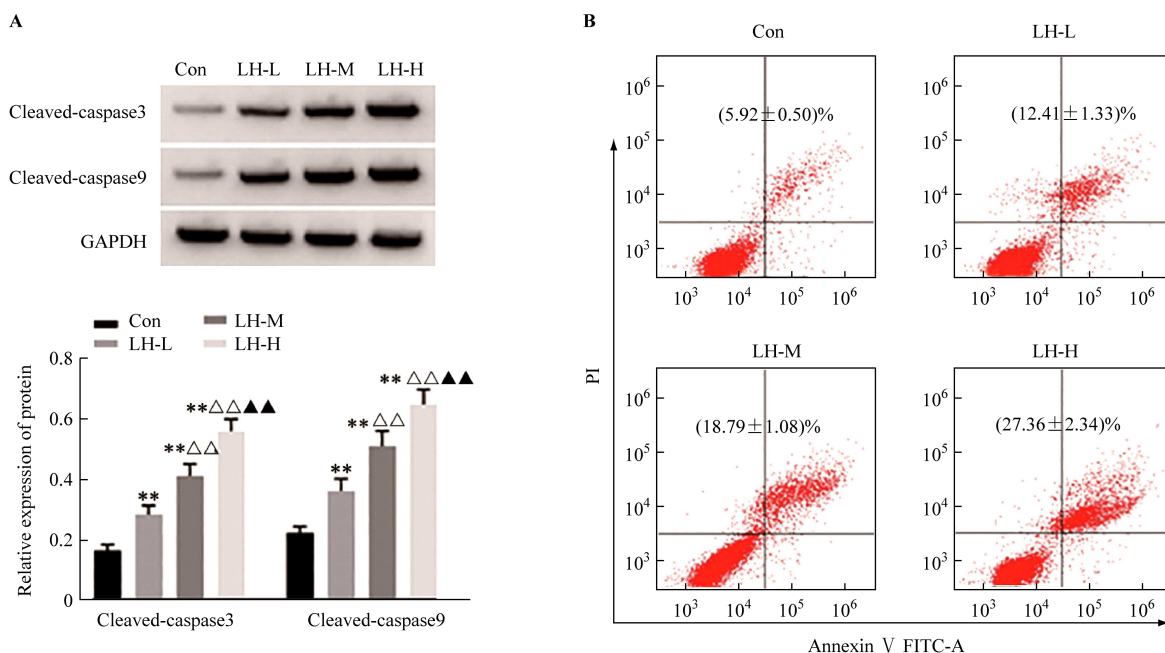
** $P < 0.01$ vs Con group, △△ $P < 0.01$ vs LH-L group, △△△ $P < 0.01$ vs LH-M group

2.2 LH促进肝癌HCCLM3细胞的凋亡

WB法(图2A)和流式细胞术(图2B)检测结果显示,与Con组比较,LH-L、LH-M、LH-H组细胞凋亡率均显著升高($P < 0.01$),凋亡相关蛋白cleaved-caspase3、cleaved-caspase9表达水平升高(均 $P < 0.01$),且不同剂量组间比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

2.3 LH抑制肝癌HCCLM3细胞的迁移、侵袭

与Con组比较,LH-L组、LH-M组、LH-H组划痕愈合率降低($P < 0.01$),侵袭细胞数减少($P < 0.01$),E-cadherin蛋白水平升高($P < 0.01$),N-cadherin蛋白水平降低($P < 0.01$),且不同剂量组间比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$,图3,表2)。



** $P < 0.01$ vs Con group, △△ $P < 0.01$ vs LH-L group, △△△ $P < 0.01$ vs LH-M group

A: Expression of apoptosis-related protein; B: Apoptosis detected by flow cytometry

图2 LH对肝癌HCCLM3细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of LH on the apoptosis of liver cancer HCCLM3 cells

2.4 LH对肝癌HCCLM3细胞中circASH2L和miR-124-3p表达的影响

qPCR检测结果(表3)显示,与Con组比较,LH-L

组、LH-M组、LH-H组circASH2L的表达水平降低($P < 0.01$),miR-124-3p的表达水平升高($P < 0.01$),且不同剂量组间比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

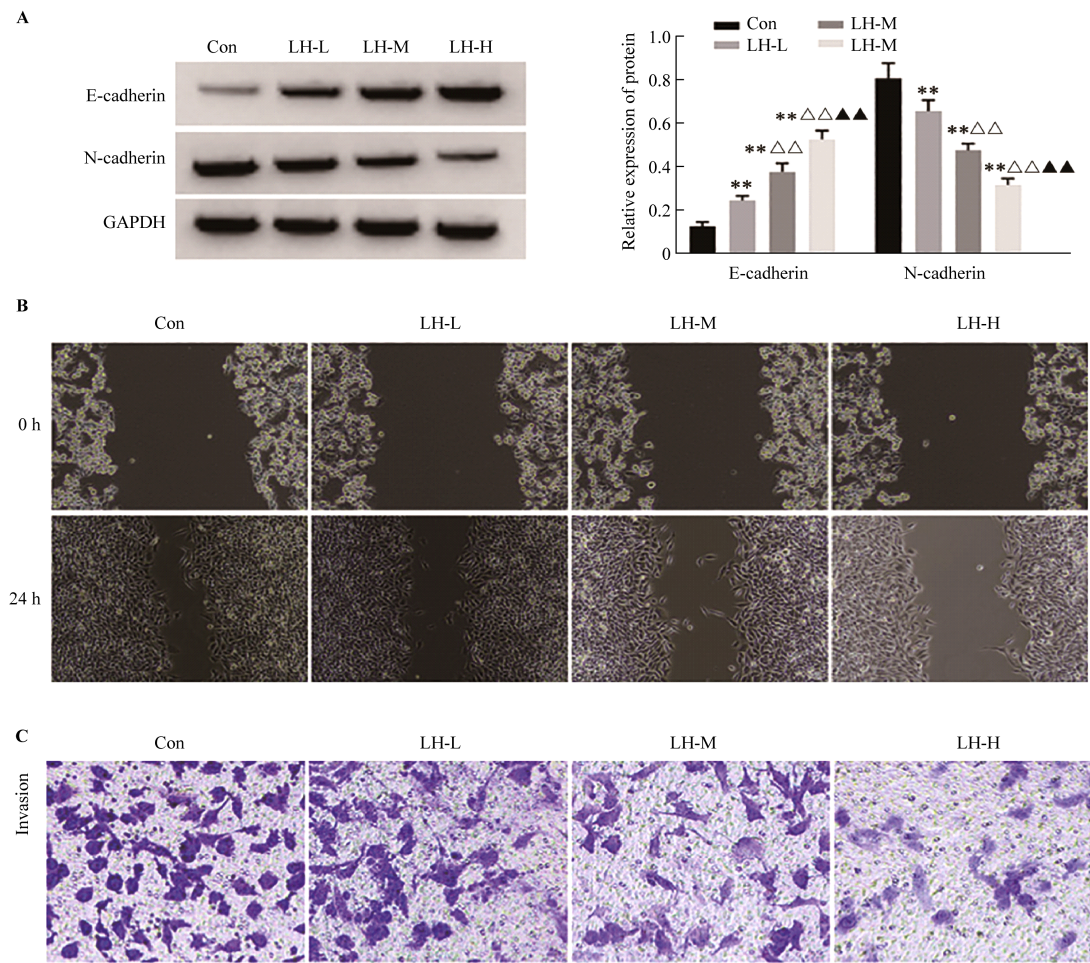


图3 LH对肝癌 HCCLM3 细胞迁移和侵袭的影响

Fig.3 Effect of LH on the migration and invasion of liver cancer HCCLM3 cells

表2 LH对肝癌 HCCLM3 细胞迁移和侵袭的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Effect of LH on the migration and invasion of liver cancer HCCLM3 cells ($\bar{x}\pm s$)

Group	Wound-healing rate/%	Number of invasion cells
Con	66.95±5.03	84.17±7.12
LH-L	48.23±5.92**	67.70±5.84**
LH-M	36.14±3.69** $\Delta\Delta$	51.69±6.02** $\Delta\Delta$
LH-H	22.67±2.74** $\Delta\Delta\Delta$	33.91±3.17** $\Delta\Delta\Delta$
F	156.178	127.390
P	0.000	0.000

** $P<0.01$ vs Con group, $\Delta\Delta P<0.01$ vs LH-L group, $\Delta\Delta\Delta P<0.01$ vs LH-M group

2.5 circASH2L靶向调控 miR-124-3p 的表达

StarBase 预测结果(图4)显示, circASH2L 与 miR-124-3p 存在结合位点。双荧光素酶报告基因实验检测结果(表4)显示, 共转染 miR-124-3p mimic 可明显降低野生型载体 WT-circASH2L 的荧光素酶活

表3 LH对肝癌 HCCLM3 细胞中 circASH2L 和 miR-124-3p 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Effect of LH on the expression of circASH2L and miR-124-3p in HCCLM3 cells ($\bar{x}\pm s$)

Group	circASH2L expression	miR-124-3p expression
Con	1.00±0.06	1.00±0.07
LH-L	0.81±0.06**	1.89±0.16**
LH-M	0.63±0.05** $\Delta\Delta$	2.67±0.22** $\Delta\Delta$
LH-H	0.48±0.04** $\Delta\Delta\Delta$	3.49±0.25** $\Delta\Delta\Delta$
F	161.204	289.008
P	0.000	0.000

** $P<0.01$ vs Con group, $\Delta\Delta P<0.01$ vs LH-L group, $\Delta\Delta\Delta P<0.01$ vs LH-M group

性($P<0.01$), 而未能影响突变型载体 MUT-circASH2L 的荧光素酶活性。与 pcDNA 组比较, pcDNA-circASH2L 组 miR-124-3p 的表达水平降低(0.42 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.06 , $P<0.05$); 与 si-NC 组比较, si-circASH2L 组 miR-124-3p 的表达水平升高(2.89 ± 0.24 vs 1.03 ± 0.07 , $P<0.05$)。

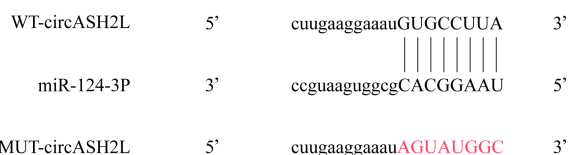


图4 CircASH2L的序列中含有与miR-124-3p互补的核苷酸序列

Fig.4 The sequence of circASH2L contains a nucleotide sequence complementary to miR-124-3p

2.6 干扰circASH2L表达对肝癌HCCLM3细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响

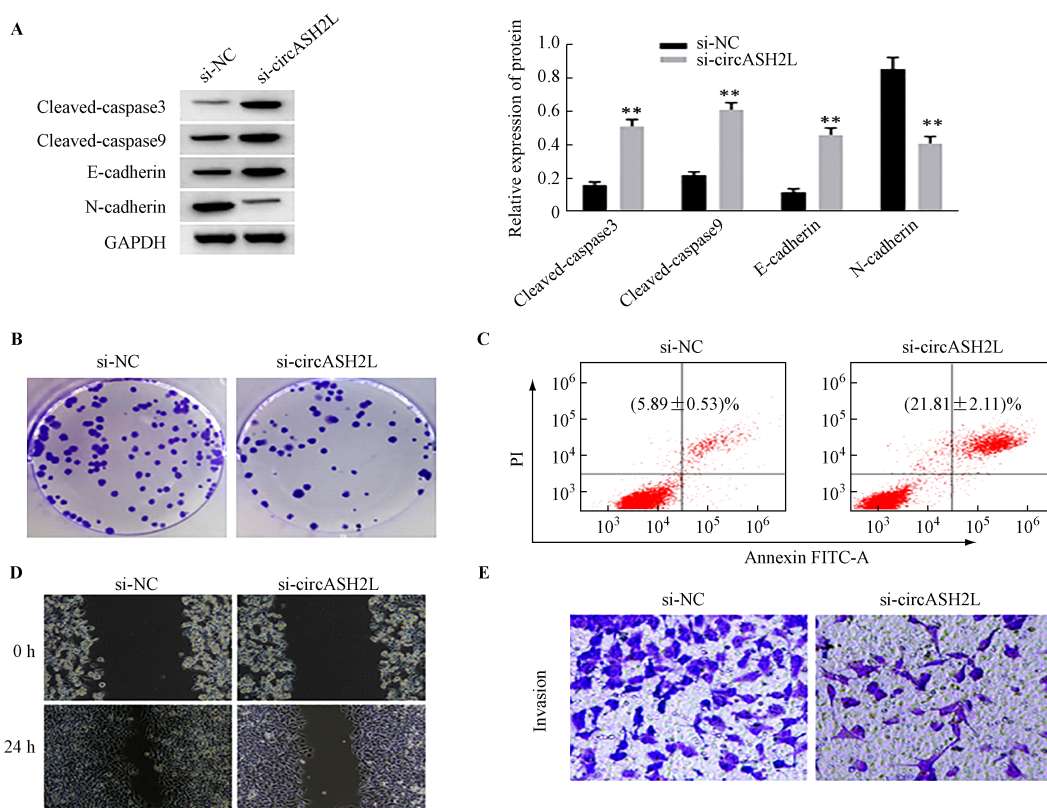
与si-NC组比较, si-circASH2L组细胞增殖抑制率升高 $[(58.77 \pm 6.11)\% \text{ vs } (6.33 \pm 0.69)\%, P < 0.01]$, 克隆形成数减少 $[(42.77 \pm 4.43) \text{ vs } (96.23 \pm 7.49) \text{ 个}, P < 0.01]$, 凋亡率升高 $[(21.81 \pm 2.11)\% \text{ vs } (5.89 \pm 0.53)\%, P < 0.01]$, 划痕愈合率降低 $[(30.89 \pm 3.16)\%$

表4 CircASH2L靶向结合miR-124-3p($\bar{x} \pm s$)
Tab.4 CircASH2L targeted binding miR-124-3p($\bar{x} \pm s$)

Group	Relative luciferase activity	
	WT-circASH2L	MUT-circASH2L
miR-NC	0.99±0.06	0.97±0.05
miR-124-3p	0.39±0.03**	1.00±0.06
<i>t</i>	26.833	1.152
<i>P</i>	0.000	0.266

** $P < 0.01$ vs miR-NC group

vs $(68.13 \pm 6.17)\%$, $P < 0.01$], 侵袭细胞数减少 $[(43.95 \pm 4.00) \text{ vs } (85.88 \pm 7.62) \text{ 个}, P < 0.05]$, cleaved-caspase3、cleaved-caspase9、E-cadherin蛋白水平升高而N-cadherin蛋白水平降低(均 $P < 0.01$, 图5)。



** $P < 0.05$ vs si-NC group

A: Expression of apoptosis, migration and invasion-related proteins; B: Effect of circASH2L expression on the clone formation of HCCLM3 cells; C: Effect of circASH2L expression on the apoptosis of HCCLM3 cells;
D: Effect of circASH2L expression on the migration of HCCLM3 cells ($\times 100$);
E: Effect of circASH2L expression on the invasion of HCCLM3 cells ($\times 200$)

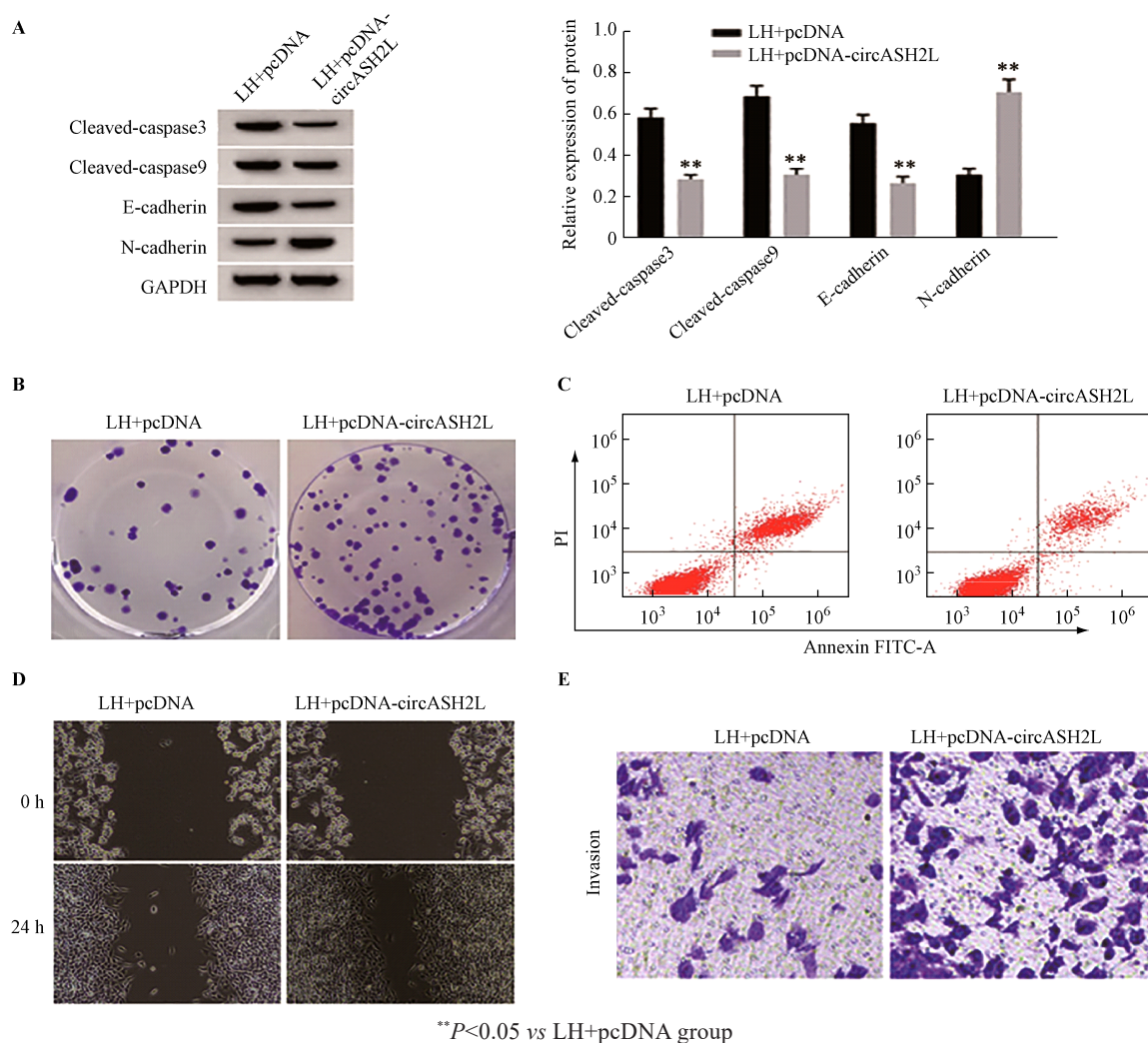
图5 干扰circASH2L表达对肝癌HCCLM3细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响

Fig.5 Effect of interfering with circASH2L expression on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of liver cancer HCCLM3 cells

2.7 circASH2L过表达逆转了LH对肝癌HCCLM3细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的作用

与LH+pcDNA组比较, LH+pcDNA-circASH2L组miR-124-3p的表达水平降低($P < 0.05$), 细胞增殖抑制率降低($P < 0.05$), 克隆形成数增多($P < 0.05$),

凋亡率降低($P < 0.05$), 划痕愈合率升高($P < 0.05$), 侵袭细胞数增多($P < 0.05$), cleaved-caspase3、cleaved-caspase9、E-cadherin蛋白水平降低(均 $P < 0.01$), N-cadherin蛋白水平升高($P < 0.01$, 图6, 表5)。



A: Expression of apoptosis, migration and invasion-related proteins; B: CircASH2L overexpression reversed the effect of LH on the clone formation of HCCLM3 cells; C: CircASH2L overexpression reversed the effect of LH on the apoptosis of HCCLM3 cells; D: CircASH2L overexpression reversed the effect of LH on the migration of HCCLM3 cells ($\times 100$); E: CircASH2L overexpression reversed the effect of LH on the invasion of HCCLM3 cells ($\times 200$)

图6 circASH2L过表达逆转了LH对肝癌HCCLM3细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的作用

Fig.6 Overexpression of circASH2L reversed the effects of LH on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of liver cancer HCCLM3 cells

表5 CircASH2L过表达逆转了LH对肝癌HCCLM3细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的作用($\bar{x} \pm s$)

Tab.5 CircASH2L overexpression reversed the effects of LH on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of liver cancer HCCLM3 cells ($\bar{x} \pm s$)

[illegible]

3 讨论

术后肿瘤细胞转移是肝癌患者预后的危险因素。肝癌转移涉及多种基因异常表达及相关信号通路异常,中草药来源的单体化合物在肝癌等肿瘤的治疗上具有良好的应用前景^[8]。circRNA 具有稳定性、多样性与组织特异性等特性,可充当 miRNA 的海绵分子来调控细胞增殖及转移等生物学过程。circRNA 在肝癌中表达异常。并可调节肝癌细胞增殖、迁移及侵袭等生物学行为,还可能作为肝癌靶向治疗的潜在靶点^[9-10],但 circRNA 是否可作为中草药抗肿瘤的治疗靶点尚未被阐明。

LH 通过激活 FBXW7-MCL1 轴而抑制胃癌细胞增殖并诱导凋亡^[11]。LH 通过死亡受体途径诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡^[12],但 LH 对肝癌细胞生物学行为的影响尚未可知。本研究结果显示,随着 LH 浓度的升高,HCCLM3 细胞增殖抑制率升高,而克隆形成数减少,提示 LH 可抑制 HCCLM3 细胞增殖及克隆形成,且呈剂量依赖性。线粒体凋亡途径是诱导细胞凋亡的主要途径之一,当细胞接收到凋亡信号时线粒体释放细胞色素 c 而激活 caspase 级联反应,进而促进细胞凋亡^[13]。本研究结果显示, LH 作用后 HCCLM3 细胞凋亡率升高,凋亡相关蛋白 cleaved-caspase3、cleaved-caspase9 水平升高,且随着药物浓度的升高而明显升高,提示 LH 可促进肝癌细胞凋亡,且呈剂量依赖性。肿瘤细胞转移与 EMT 有关, E-cadherin 表达下调或 N-cadherin 表达上调均可促进 EMT 进而增强细胞转移能力^[14]。本研究结果显示, LH 可明显降低 HCCLM3 细胞划痕愈合率,减少侵袭细胞数,促进 E-cadherin 表达而抑制 N-cadherin 表达,且呈剂量依赖性,提示 LH 可抑制 HCCLM3 细胞迁移及侵袭。

本研究进一步探究 LH 调控 HCCLM3 细胞生物学行为的作用机制,结果显示, LH 处理后 HCCLM3 细胞中 circASH2L 的表达水平降低,而 miR-124-3p 的表达水平升高,提示 LH 可能通过调控 circASH2L/miR-124-3p 轴而发挥抗肝癌的作用。circ-ASH2L 通过充当 miR-34a 的海绵分子而促进胰腺导管腺癌进展^[15]。本研究结果显示,干扰 circASH2L 表达后 HCCLM3 细胞增殖抑制率升高,细胞的克隆形成、迁移及侵袭能力均明显降低,而细胞凋亡率明显升高,提示干扰 circASH2L 表达可抑制 HCCLM3 细胞增殖、克隆形成、迁移及侵袭,还可促进细胞凋亡。本研究证实 HCCLM3 细胞中 circASH2L 可靶向结合 miR-124-3p,并可负向调控 miR-124-3p 的表达。研究表明, miR-124-3p 在子宫内膜癌^[16]、结直肠癌^[17]、

膀胱癌^[18]和胃癌^[19-20]等肿瘤中表达下调,并可调控细胞增殖及转移等生物学过程。本研究结果显示, circASH2L 过表达后可明显降低 miR-124-3p 的表达水平,进而降低 LH 对 HCCLM3 细胞增殖、克隆形成、凋亡、迁移及侵袭的作用,提示 circASH2L 过表达可逆转 LH 对 HCCLM3 细胞生物学功能的作用。

综上所述, LH 可抑制 HCCLM3 细胞增殖、克隆形成、迁移及侵袭,并可促进细胞凋亡,还可抑制细胞中 circASH2L 的表达而促进 miR-124-3p 的表达,同时证实 circASH2L 可靶向结合 miR-124-3p,表明 LH 调控 HCCLM3 细胞生物学行为与 circASH2L/miR-124-3p 轴密切相关, circASH2L 可能是肝癌治疗的潜在靶点。结果为进一步揭示 LH 抗肝癌的分子机制奠定实验基础,但仍需进行体内动物实验进一步验证 LH 对肝癌生长的抑制作用。

[参 考 文 献]

- [1] 杨静波,李宏杰.苦参碱和氧化苦参碱对肝癌细胞增殖和凋亡的影响[J].中国临床药理学杂志,2018,34(9):1067-1069. DOI: CNKI:SUN:GLYZ.0.2018-09-017.
- [2] 杨爱琳,夏天吉,赵亚楠,等.槐耳清膏通过激活自噬抑制人肝癌细胞 SK-HEP-1 增殖[J].中国中药杂志,2018,43(3):591-595. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20171113.012.
- [3] 郑雪莹,曹宁宁,裴帅,等.人参皂苷 Rh2 抗肝癌作用机制的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(20):208-213. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20191329.
- [4] 张伟,崔恩海.石蒜碱诱导肺癌 A549 细胞凋亡作用研究[J].中国中药杂志,2015,40(16):3278-3282. DOI: 10.4268/cjcm.20151630.
- [5] CHENG J, LI X, YANG L, et al. circASH2L promotes ovarian cancer tumorigenesis, angiogenesis, and lymph angiogenesis by regulating the miR-665/VEGFA axis as a competing endogenous RNA[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8(1): 595585-595595. DOI: 10.3389/fcell.2020.595585.
- [6] MAJID A, WANG J, NAWAZ M, et al. miR-124-3p suppresses the invasiveness and metastasis of hepatocarcinoma cells via targeting CRKL[J]. Front Mol Biosci, 2020, 7(1): 223-233. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00223.
- [7] 彭聪,徐佳,伍春莲.盐酸石蒜碱对人食管癌细胞 Eca-109 增殖及凋亡的影响[J].西华师范大学学报(自然科学版),2015,36(1):7-11. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5072.2015.01.002.
- [8] 彭文婷,孙妮弋,孙家昌,等.人参皂苷 CK 对人肝癌细胞 HepG2 迁移及侵袭的影响[J].中国药理学通报,2018,34(1):27-32. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2018.01.008.
- [9] LIU Z, YU Y, HUANG Z, et al. CircRNA-5692 inhibits the progression of hepatocellular carcinoma by sponging miR-328-5p to enhance DAB2IP expression[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(12): 900-910. DOI:10.1038/s41419-019-2089-9.
- [10] LIN Q, LING Y B, CHEN W, et al. Circular RNA circCDK13 suppresses cell proliferation, migration and invasion by modulating the JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in liver cancer[J]. Int J Oncol, 2018, 53(1): 246-256. DOI:10.3892/ijo.2018.4371.

- [11] LI C, DENG C, PAN G, et al. Lycorine hydrochloride inhibits cell proliferation and induces apoptosis through promoting FBXW7-MCL1 axis in gastric cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 230-240. DOI:10.1186/s13046-020-01743-3.
- [12] JI Y, YU M, QI Z, et al. Study on apoptosis effect of human breast cancer cell MCF-7 induced by lycorine hydrochloride via death receptor pathway[J]. *Saudi Pharm J*, 2017, 25(4): 633-637. DOI:10.1016/j.jsps.2017.04.036.
- [13] ZHU X, LI Z, LI T, et al. Posthole inhibits the PI3K/AKT signaling pathway via activation of PTEN and induces cell cycle arrest and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Bio Pharm*, 2018, 102(1): 502-509. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.106.
- [14] NIU X Y, ZHANG Z Q, MA P L. MiRNA-221-5p promotes breast cancer progression by regulating E-cadherin expression[J]. *Eur Rev Med Pharm Sci*, 2019, 23(16): 6983-6990. DOI: 10.26355/eurrev_201908_18738.
- [15] CHEN Y, LI Z, ZHANG M, et al. Circ-ASH2L promotes tumor progression by sponging miR-34a to regulate Notch1 in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res: CR*, 2019, 38(1): 466-476. DOI:10.1186/s13046-019-1436-0.
- [16] LV Y, CHEN S, WU J, et al. Upregulation of long non-coding RNA OGFRP1 facilitates endometrial cancer by regulating miR-124-3p/SIRT1 axis and by activating PI3K/AKT/GSK-3 β pathway[J]. *Art Cells Nan Bio*, 2019, 47(1): 2083-2090. DOI: 10.1080/21691401.2019.1617727.
- [17] CHEN Z Y, WANG X Y, YANG Y M, et al. LncRNA SNHG16 promotes colorectal cancer cell proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition through miR-124-3p/MCP-1 [J]. *Gene Ther*, 2020, 28(1): 1-9. DOI: 10.1038/s41434-020-0176-2.
- [18] FU W, WU X, YANG Z, et al. The effect of miR-124-3p on cell proliferation and apoptosis in bladder cancer by targeting EDNRB[J]. *Arch Med Sci*, 2019, 15(5): 1154-1162. DOI:10.5114/aoms.2018.78743.
- [19] WU Q, ZHONG H, JIAO L, et al. MiR-124-3p inhibits the migration and invasion of Gastric cancer by targeting ITGB3[J]. *Pothole Res Pact*, 2020, 216(1): 152762-152772. DOI: 10.1016/j.prp.2019.152762.
- [20] HUANG H G, TANG X L, HUANG X S, et al. Long noncoding RNA LINC00511 promoted cell proliferation and invasion via regulating miR-124-3p/EZH2 pathway in gastric cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(8): 4232-4245. DOI:10.26355/eurrev_202004_21003.
- [收稿日期] 2021-05-02 [修回日期] 2021-08-03
[本文编辑] 韩丹