

本文引用: 袁小波, 肖桂香, 唐静, 李丽娟, 李雨静. 款冬花多糖通过调控 miR-4282 表达抑制宫颈癌细胞增殖、迁移侵袭的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(6): 991-1000.

款冬花多糖通过调控 miR-4282 表达抑制宫颈癌细胞增殖、迁移侵袭的机制研究

袁小波¹, 肖桂香^{1*}, 唐静^{1*}, 李丽娟², 李雨静¹

1. 湖南交通工程学院护理与医学技术学院, 湖南 衡阳 421219; 2. 郴州市第一人民医院产科, 湖南 郴州 423000

[摘要] **目的** 探讨款冬花多糖通过调控 miR-4282 表达抑制宫颈癌细胞增殖、迁移侵袭的机制。**方法** 体外培养人宫颈癌细胞株 HeLa 和 C-33A 并以 10、20、40、80、120 mg·L⁻¹ 的款冬花多糖处理, 然后通过 CCK-8 实验测定各组细胞存活率并筛选款冬花多糖最佳作用浓度。将 HeLa 和 C-33A 细胞随机分为对照组、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)组、款冬花多糖组、miR-4282 mimics 组、阴性对照组、款冬花多糖+miR-4282 inhibitor 组, 分组处理后通过 RT-PCR 检测各组细胞 miR-4282 表达; 通过 CCK-8 实验、EDU 实验、流式细胞实验分别检测各组细胞增殖、凋亡; 通过划痕实验、Transwell 实验检测各组细胞迁移、侵袭情况; 通过 Western blot 法检测各组细胞增殖相关蛋白(Cyclin D1)、凋亡相关蛋白[B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 关联 X 蛋白(B-cell lymphoma-2 related X protein, Bax)]、上皮-间质转化相关蛋白[Vimentin、基质金属蛋白酶 2(matrix metallo-proteinases 2, MMP-2)、E-cadherin]表达。**结果** 与对照组相比, 5-FU 组、款冬花多糖组、miR-4282 mimics 组细胞存活率、EDU 阳性率、迁移率、迁移数、侵袭数、Cyclin D1 与 Bcl-2、Vimentin、MMP-2 蛋白表达降低($P<0.05$), miR-4282 表达、凋亡率、Bax 与 E-cadherin 蛋白表达升高($P<0.05$); 阴性对照组细胞各指标无明显变化($P>0.05$)。与款冬花多糖组相比, 款冬花多糖+miR-4282 inhibitor 组细胞存活率、EDU 阳性率、迁移率、迁移数、侵袭数、Cyclin D1 与 Bcl-2、Vimentin、MMP-2 蛋白表达升高($P<0.05$), miR-4282 表达、凋亡率、Bax 与 E-cadherin 蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** 款冬花多糖可通过上调 miR-4282 表达而抑制宫颈癌细胞增殖、迁移侵袭并促使其凋亡, 最终对其起到明显抑癌作用。

[关键词] 款冬花多糖; miR-4282 表达; 宫颈癌; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.06.009

Mechanism of polysaccharide of Farfarae Flos in inhibiting proliferation, migration, and invasion of cervical cancer cells by regulating miR-4282 expression

YUAN Xiaobo¹, XIAO Guixiang^{1*}, TANG Jing^{1*}, LI Lijuan², LI Yujing¹

1. School of Nursing and Medical Technology, Hunan Institute of Traffic Engineering, Hengyang, Hunan 421219, China;

2. Obstetrics Department of the First People's Hospital of Chenzhou, Chenzhou, Hunan 423000, China

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of polysaccharide of Farfarae Flos in inhibiting the proliferation, migration, and invasion of cervical cancer cells by regulating miR-4282 expression. **Methods** Human cervical cancer cell lines HeLa and C-

[收稿日期] 2023-12-27

[基金项目] 衡阳市科学技术局 2022 年度指导性计划项目(202222035745)。

[通信作者] * 唐静, 女, 讲师, E-mail: jsdx6666@126.com; 肖桂香, 女, 副教授, E-mail: 394462021@qq.com。

33A were cultured in vitro and treated with 10, 20, 40, 80, and 120 mg·L⁻¹ of polysaccharide of Farfarae Flos. CCK-8 assay was used to determine the survival rate of each group of cells and screen the optimal concentration of polysaccharide of Farfarae Flos. HeLa and C-33A cells were randomly grouped into control group, fluorouracil (5-FU) group, polysaccharide of Farfarae Flos group, miR-4282 mimics group, negative control group, and polysaccharide of Farfarae Flos+miR-4282 inhibitor group. The miR-4282 expression was examined by RT-PCR; the cell proliferation and apoptosis were determined by CCK-8 assay, EDU assay, and flow cytometry; the cell migration and invasion were checked by scratch and transwell assays; immunoblotting was used to examine the expression of cell proliferation related proteins (Cyclin D1), apoptosis related proteins (Bax, Bcl-2), epithelial mesenchymal transition-related proteins [Vimentin, Matrix Metallo-proteinases 2 (MMP2), E-cadherin]. **Results** Compared with the control group, the cell survival rate, EDU positivity rate, migration rate, migration number, invasion number, the Cyclin D1 protein expression as well as protein expressions of Bcl-2, Vimentin, and MMP-2 in 5-FU group, polysaccharide of Farfarae Flos group, and miR-4282 mimics group decreased ($P<0.05$), while the miR-4282 expression, apoptosis rate, and protein expressions of Bax and E-cadherin increased ($P<0.05$). There was no significant change in various indicators of cells in the negative control group ($P>0.05$). Compared with the polysaccharide of Farfarae Flos group, the cell survival rate, EDU positivity rate, migration rate, migration number, invasion number, the Cyclin D1 protein expression as well as protein expressions of Bcl-2, Vimentin, and MMP-2 in the polysaccharide of Farfarae Flos+miR-4282 inhibitor group were higher ($P<0.05$), while the miR-4282 expression, apoptosis rate, and protein expressions of Bax and E-cadherin were lower ($P<0.05$). **Conclusion** The polysaccharide of Farfarae Flos can inhibit the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of cervical cancer cells by up-regulating the miR-4282 expression, ultimately playing a significant role in cancer suppression.

[**Keywords**] polysaccharide of Farfarae Flos; miR-4282 expression; cervical cancer; proliferation; migration; invasion

宫颈癌是常见的女性生殖系统恶性肿瘤,具有早期诊断困难、恶性程度高、预后差等特点,给女性生殖健康和生命安全造成严重威胁,已成为导致女性癌症死亡的重要原因^[1-2]。癌症的发生发展是由多基因参与、多因素影响的多阶段过程,miR-4282作为一种具有抑癌活性的微小RNA在其中起到关键作用,研究显示,miR-4282在胰腺癌中低表达并可预测胰腺癌患者不良预后,miR-4282的过表达可显著降低胰腺癌细胞的迁移能力并抑制其恶性进展^[3]。miR-4282低表达的上皮性卵巢癌患者的淋巴转移和远处转移发生率较高,而miR-4282的过表达可削弱上皮性卵巢癌细胞转移能力^[4]。此外miR-4282在乳腺癌组织中表达下调且与其患者癌细胞转移的发生和临床分级有关,恢复miR-4282的表达可抑制乳腺癌细胞的增殖、上皮-间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)、迁移和侵袭并促进其凋亡^[5]。因而,miR-4282可作为宫颈癌的潜在治疗靶点。款冬花具有抗炎、抗肿瘤、镇咳祛痰等药理作用,其提取物对肺癌细胞可起到增殖抑制作用^[6-8],其花蕾提取物中的款冬花多糖可体外抑制

肺癌细胞增殖并诱导其凋亡^[9]。刘宜峰等^[10]研究表明,款冬花多糖可通过上调miR-99a而抑制食管癌细胞的增殖、迁移和侵袭。因此,推测款冬花多糖可能通过调控miR-4282而对宫颈癌发挥抗癌作用,本文通过体外培养人宫颈癌细胞株HeLa和C-33A,探究款冬花多糖通过调控miR-4282表达抑制宫颈癌细胞增殖、迁移侵袭的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人宫颈癌细胞株HeLa、C-33A(货号TCH-C193、TCH-C143),购自上海慧颖生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)(货号LM1066,纯度98%,上海联迈生物工程有限公司);款冬花多糖(货号121449,纯度 $\geq 98\%$,扶风斯诺特生物科技有限公司);miR-4282 mimics、inhibitor及其阴性对照(货号HY-R00961,江苏赛索飞生物科技有限公司);一步法RT-PCR检测试剂盒(货号FG2210,北京凡知医学科技有限公司);Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号E-CK-A211)、EdU细胞

增殖成像检测试剂盒(货号 E-CK-A378)、增强型CCK-8 细胞活力检测试剂盒(货号 E-CK-A362)、山羊抗兔二抗(批号 E-AB-1114),均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;兔源抗人 Cyclin D1、B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 关联 X 蛋白(B-cell lymphoma-2 related X protein, Bax)、上皮-间质转化相关蛋白[Vimentin、基质金属蛋白酶 2 (matrix metallo-proteinases 2, MMP-2)、E-cadherin]一抗(货号 ab134175、ab32503、ab227639、ab32124、ab9485、ab16700、ab92536)、结晶紫染色液(货号 ab246820)均购自英国 Abcam 公司。

1.3 主要仪器

WEF-2008 型全自动多功能酶标仪(上海沃尔福实业有限公司);FACSMelody 流式细胞仪(美国 BD 公司);LB102 生物显微镜(广州市莱特光电技术有限公司);FluorChem Q 蛋白印迹成像和定量分析系统(英国 SYGENE 公司);PowerEase Touch 350W 触屏电源、iblot 3 Western Blot 转印系统、XCell-SureLock Mini-Cell 电泳槽(中国赛默飞世尔科技有限公司)。

1.4 人宫颈癌细胞株 HeLa 和 C-33A 体外培养及款冬花多糖在细胞中最佳作用浓度筛选

快速解冻 HeLa、C-33A 细胞,用 MEM 培养液(含 10%胎牛血清、1%青-链霉素双抗)复苏培养,传代 2 次后以每孔 1×10^4 个的密度将 HeLa 和 C-33A 细胞分别接种在 96 孔板中培养,分别以终浓度 0(设为对照组)、10、20、40、80、120 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的款冬花多糖处理 HeLa 和 C-33A 细胞^[10]24 h,每组 6 个复孔并设置不接种细胞的空白对照组,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 90 min 后测量各组细胞吸光度(optical density, OD)值,重复操作 3 遍,根据公式算出各组细胞存活率,细胞存活率=(OD 值药物处理组-OD 值空白对照组)/(OD 值对照组-OD 值空白对照组) $\times 100\%$ 。

1.5 HeLa 和 C-33A 细胞分组和处理

HeLa 和 C-33A 细胞传代 2 次后以每孔 1×10^5 个的密度分别接种在 24 孔板中,随机分为对照组、5-FU 组、款冬花多糖组、miR-4282 mimics 组、阴性对照组、款冬花多糖+miR-4282 inhibitor 组。对照组正常培养不做处理,此外其余各组进行分组处理:5-FU 组以终浓度 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 5-FU 处理^[11],款冬花多糖组以终浓度 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的款冬花多糖(根据 CCK-8 实验得到的半数抑制浓度确定款冬花多糖干预浓度)处理,miR-4282 mimics 组以脂质体 2000 转染 100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 miR-4282 mimics,阴性对照组以脂质体 2000 转染 100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 miR-4282 阴性对照,款冬花多糖+miR-4282 inhibitor 组以终浓度 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的款冬花多糖+以脂质体 2000 转染 100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 miR-4282 inhibitor 同时处理,miR-4282 mimics 及其阴性对照浓度参考各自说明书设定,转染方法见脂质体 2000 说明书,各组细胞均于处理 24 h 后做后续检测。

1.6 指标检测

1.6.1 RT-PCR 实验检测各组 HeLa 和 C-33A 细胞 miR-4282 表达水平 用 TRIzol 试剂提取处理后的各组细胞总 RNA,按照一步法 RT-PCR 检测试剂盒操作步骤进行 RT-PCR 反应,得到的各基因循环阈值采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法进行分析,并选择 U6 作为 miR-4282 内参基因,重复操作 3 遍,引物序列见表 1。

1.6.2 CCK-8 实验、EDU 实验、流式细胞实验分别检测各组细胞增殖、凋亡情况 CCK-8 实验:HeLa 和 C-33A 细胞传代 2 次后以 1×10^4 个/孔的密度分别接种在 96 孔板中,按 1.5 中方法分组处理 24 h 后进行 CCK-8 实验检测各组细胞存活率,重复操作 3 遍,实验方法如 1.4 中所示。

EDU 实验:HeLa 和 C-33A 细胞传代 2 次后以每孔 1×10^5 个的密度分别接种在 24 孔板中,按 1.5 中方法分组处理 24 h,加入 EDU 试剂处理 2.5 h 后

表 1 基因引物序列

引物名称	方向	序列(5'-3')	引物长度
miR-4282	正向	CGAGCTCTTACGCGTGCTAGCAAAGCGCCTTGAAACCCTCTC	20 bp
	反向	AGATCTCGAGCCCGGCTAGCACCTCCAGTCTGTAGTAGTGC	25 bp
U6	正向	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT	18 bp
	反向	CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT	16 bp

按 EdU 细胞增殖成像检测试剂盒操作步骤进行 EdU 染色, 荧光显微镜下拍摄各组图像, 重复操作 3 遍, 用 Image J 图像分析软件对其中 EDU 阳性细胞数目和细胞总数目进行定量, 计算各组细胞 EDU 阳性率, $\text{EDU 阳性率} = \text{EDU 阳性细胞数目} / \text{细胞总数目} \times 100\%$ 。

流式细胞实验: 取“1.5”项中药物干预后的各组 HeLa 和 C-33A 细胞, 经胰酶消化后分别收集, 使用 PBS 洗涤、重悬后测出细胞密度, 每组取约 1×10^5 个 HeLa 和 C-33A 细胞, 按 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒操作步骤进行 FITC、PI 双染, 用流式细胞仪检查各组细胞凋亡率, 重复操作 3 遍。

1.6.3 划痕实验、Transwell 实验分别检测各组细胞迁移、侵袭情况 取“1.5”项中药物干预后的各组 HeLa 和 C-33A 细胞, 经胰酶消化后分别收集, 使用 PBS 洗涤、不含血清的 MEM 基础培养基重悬后测出细胞悬浮液中细胞密度, 根据测定结果将各组 HeLa 和 C-33A 细胞制为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液, 然后进行迁移与侵袭检测。

划痕实验检测迁移: 每组分别取 2×10^5 个 HeLa 和 C-33A 细胞(细胞悬液各 200 μL)接种在 24 孔板, 等细胞贴壁生长 4 h 后在每个细胞孔底部划一条直线, 用 PBS 清洗掉划痕中的细胞, 在生物显微镜下拍摄各组图像, 用 Image J 图像分析软件对每组划痕面积数量进行定量, 病记为 S1, 等细胞生长 24 h 后再次拍摄其图像并定量各组划痕面积数量, 记为 S2, 重复操作 3 遍, 计算各组细胞迁移率, $\text{迁移率} = (S1 - S2) / S1 \times 100\%$ 。

Transwell 实验检测迁移: 每组分别取 2×10^5 个 HeLa 和 C-33A 细胞(细胞悬液各 200 μL)接种在 24 孔 Transwell 板上室, 等细胞贴壁生长 4 h 后向 Transwell 板下室加入含 10% 血清的 MEM 基础培养基, 培养 24 h 后以 PBS 清洗、4% 多聚甲醛固定迁移到下室的细胞, 以结晶紫染色液染色、PBS 清洗后在生物显微镜下拍摄各组下室内细胞图像, 重复操作 3 遍, 采用 Image J 图像分析软件对其数量进行定量, 即得到各组 HeLa 和 C-33A 细胞迁移数。

Transwell 实验检测侵袭: 取 24 孔 Transwell 板, 使用基质胶对其上室进行包被, 分别加入 HeLa 和 C-33A 细胞悬液各 200 μL , 后续操作与迁移检测相同, 重复操作 3 遍, 最终得到各组 HeLa 和 C-33A 细胞侵袭数。

1.6.4 Western blot 检测各组细胞增殖、凋亡、EMT 相关蛋白表达收集 1.5 中分组处理后的各组 HeLa 和 C-33A 细胞, 采用 RAPI 试剂在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下裂解后离心, 从而提取各组 HeLa 和 C-33A 细胞总蛋白, 采用 BCA 法分别测出每组细胞总蛋白浓度, 然后在沸水浴内加热变性各组细胞蛋白, 每组取 35 μg , 各组 HeLa 和 C-33A 细胞总蛋白样本, 上样进行电泳、转印, 于 PVDF 膜上获得按分子量大小分离开的各组蛋白, 以 5% 脱脂奶粉溶液进行封闭后剪下 GAPDH、Vimentin、MMP-2、Cyclin D1、Bax、E-cadherin 及 Bcl-2 蛋白条带, 分别孵育相对应的兔源抗人一抗, 然后孵育 HRP 偶联山羊抗兔二抗, 进行抗原抗体反应, 以化学发光试剂显色各组蛋白条带, 重复操作 3 遍, 采集其图像后运用 Image pro 软件定量其灰度值, 最后以 GAPDH 作为内参量化各组 Vimentin、MMP-2、Cyclin-D1、Bax、E-cadherin 及 Bcl-2 蛋白相对表达。

1.7 统计学分析

本文数据采用“ $\bar{x} \pm s$ ”描述, 并运用 Graph Pad Prism 8.0 软件做统计学分析, 多组间差异比较进行单因素方差分析, 进一步两两比较进行 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 款冬花多糖对 HeLa 和 C-33A 细胞存活率的影响

与 0 mg/L 款冬花多糖相比, 10、20、40、80、120 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的款冬花多糖均可降低 HeLa 和 C-33A 细胞存活率 ($P < 0.05$), 选择半数抑制浓度附近的 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的款冬花多糖进行后续实验。详见图 1。

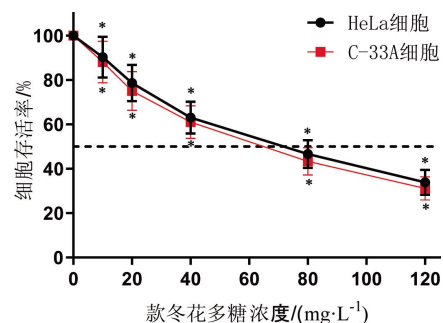


图 1 不同浓度款冬花多糖对 HeLa 和 C-33A 细胞存活率的影响

注: 与 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 款冬花多糖比较, $*P < 0.05$ 。

2.2 款冬花多糖对 HeLa 和 C-33A 细胞 miR-4282 表达的影响

与对照组相比, 5-FU 组、款冬花多糖组、miR-

4282 mimics 组细胞 miR-4282 表达升高 ($P < 0.05$), 阴性对照组细胞 miR-4282 表达无明显变化 ($P > 0.05$); 与 5-FU 组相比, 款冬花多糖组细胞 miR-4282 表达无明显变化 ($P > 0.05$); 与款冬花多糖组相比, 款冬花多糖+miR-4282 inhibitor 组细胞 miR-4282 表达降低 ($P < 0.05$)。详见图 2。

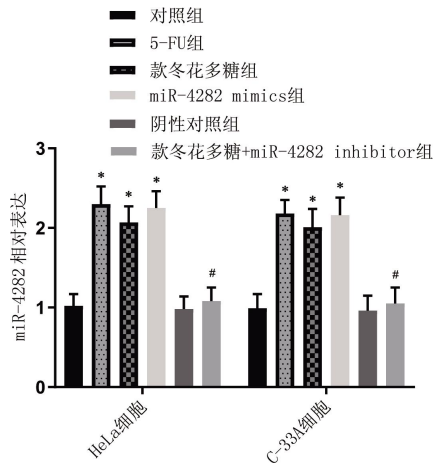


图 2 各组 HeLa 和 C-33A 细胞 miR-4282 表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与款冬花多糖组相比,* $P < 0.05$ 。

2.3 款冬花多糖对 HeLa 和 C-33A 细胞增殖、凋亡的影响

与对照组相比,5-FU 组、款冬花多糖组、miR-4282 mimics 组细胞存活率、EDU 阳性率降低 ($P < 0.05$), 凋亡率升高 ($P < 0.05$); 阴性对照组细胞存活率、EDU 阳性率、凋亡率无明显变化 ($P > 0.05$)。与 5-

FU 组相比,款冬花多糖组细胞存活率、EDU 阳性率、凋亡率无明显变化 ($P > 0.05$)。与款冬花多糖组相比,款冬花多糖+miR-4282 inhibitor 组细胞存活率、EDU 阳性率升高 ($P < 0.05$), 凋亡率降低 ($P < 0.05$)。详见图 3—5。

2.4 款冬花多糖对 HeLa 和 C-33A 细胞迁移与侵袭的影响

与对照组相比,5-FU 组、款冬花多糖组、miR-4282 mimics 组细胞迁移率、迁移数与侵袭数降低 ($P < 0.05$), 阴性对照组细胞迁移率、迁移数与侵袭数无明显变化 ($P > 0.05$); 与 5-FU 组相比,款冬花多糖组细胞迁移率、迁移数与侵袭数无明显变化 ($P > 0.05$); 与款冬花多糖组相比,款冬花多糖+miR-4282 inhibitor 组细胞迁移率、迁移数与侵袭数升高 ($P < 0.05$)。详见图 6—9。

2.5 款冬花多糖对 HeLa 和 C-33A 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组相比,5-FU 组、款冬花多糖组、miR-4282 mimics 组细胞 Cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 阴性对照组细胞 Cyclin D1、Bcl-2、Bax 蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$)。与 5-FU 组相比,款冬花多糖组细胞 Cyclin D1、Bcl-2、Bax 蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$)。与款冬花多糖组相比,款冬花多糖+miR-4282 inhi-

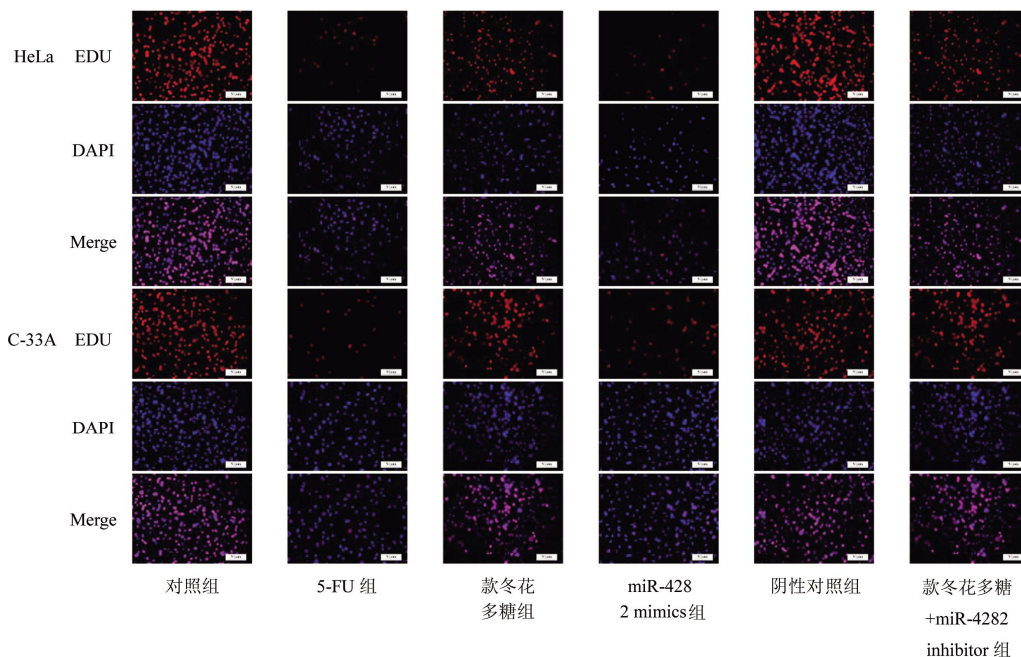


图 3 EDU 实验检测各组 HeLa 和 C-33A 细胞增殖 ($\times 200$)

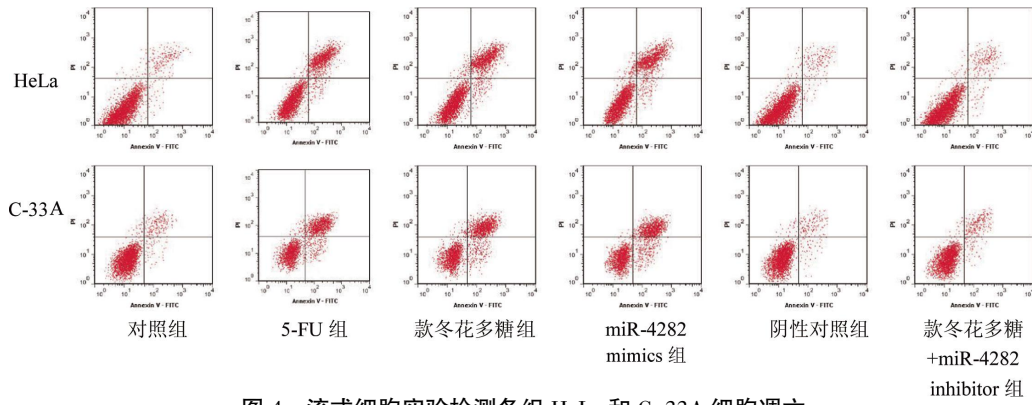


图4 流式细胞实验检测各组 HeLa 和 C-33A 细胞凋亡

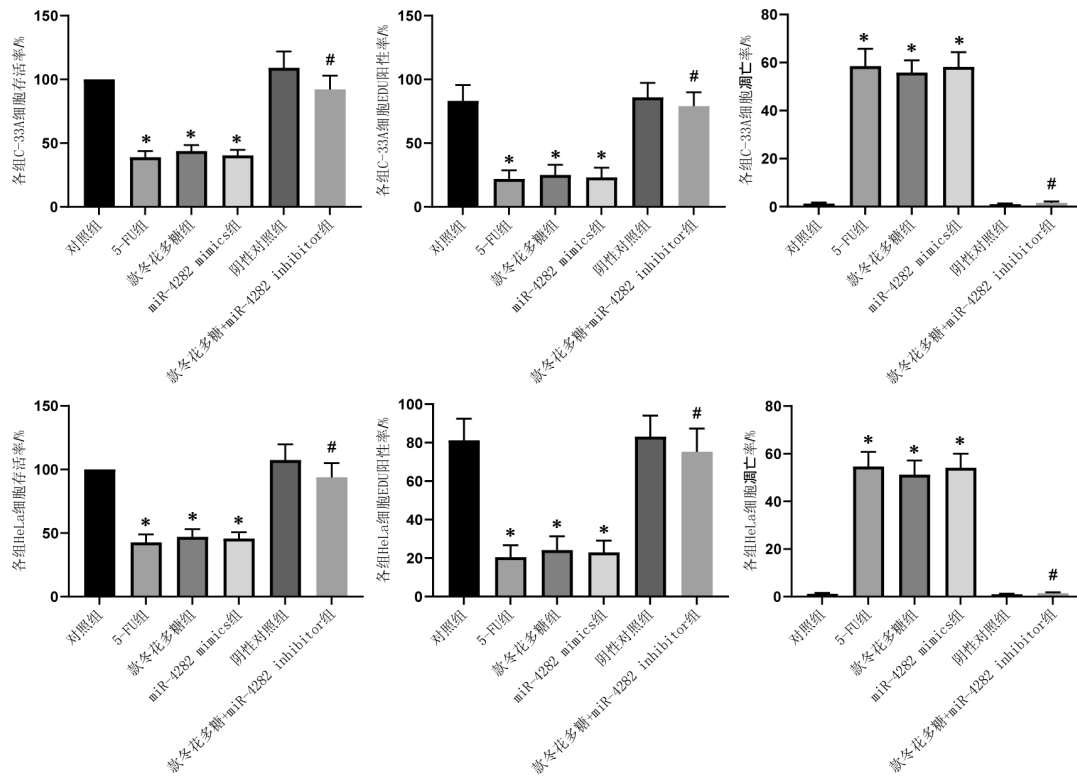


图5 各组 HeLa 和 C-33A 细胞存活率、EDU 阳性率、凋亡率($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与款冬花多糖组相比,# $P < 0.05$ 。

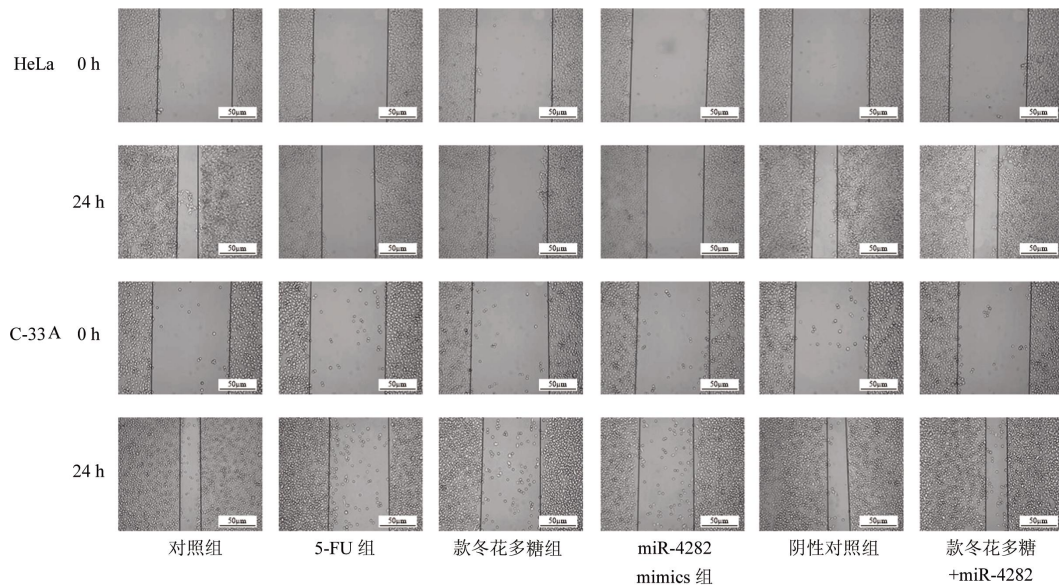


图6 划痕实验检测各组 HeLa 和 C-33A 细胞迁移($\times 200$)

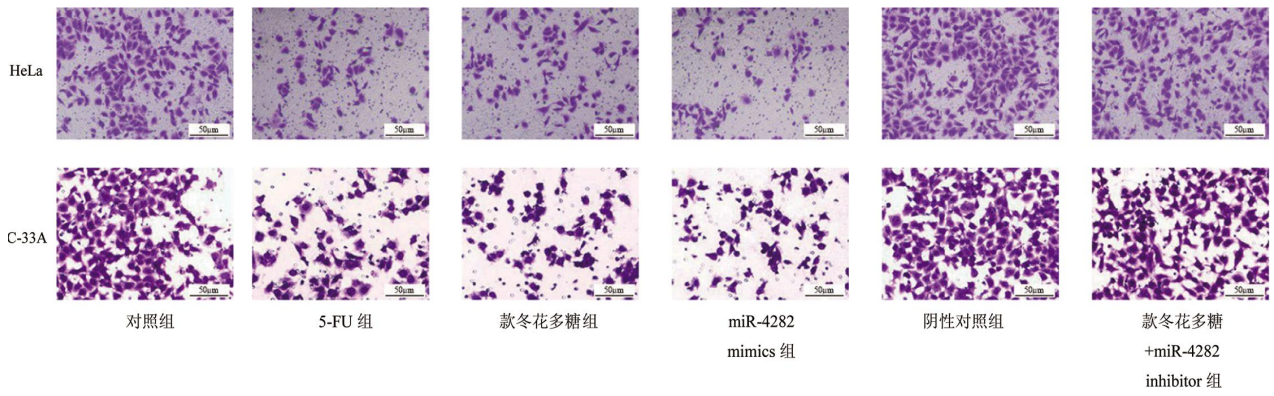


图7 Transwell实验检测各组HeLa和C-33A细胞迁移($\times 200$)

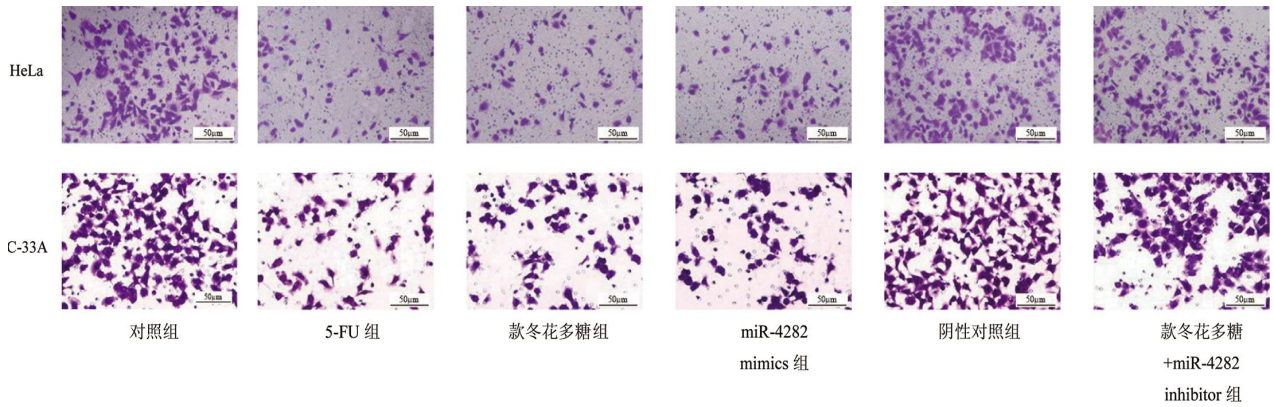


图8 Transwell实验检测各组HeLa和C-33A细胞侵袭($\times 200$)

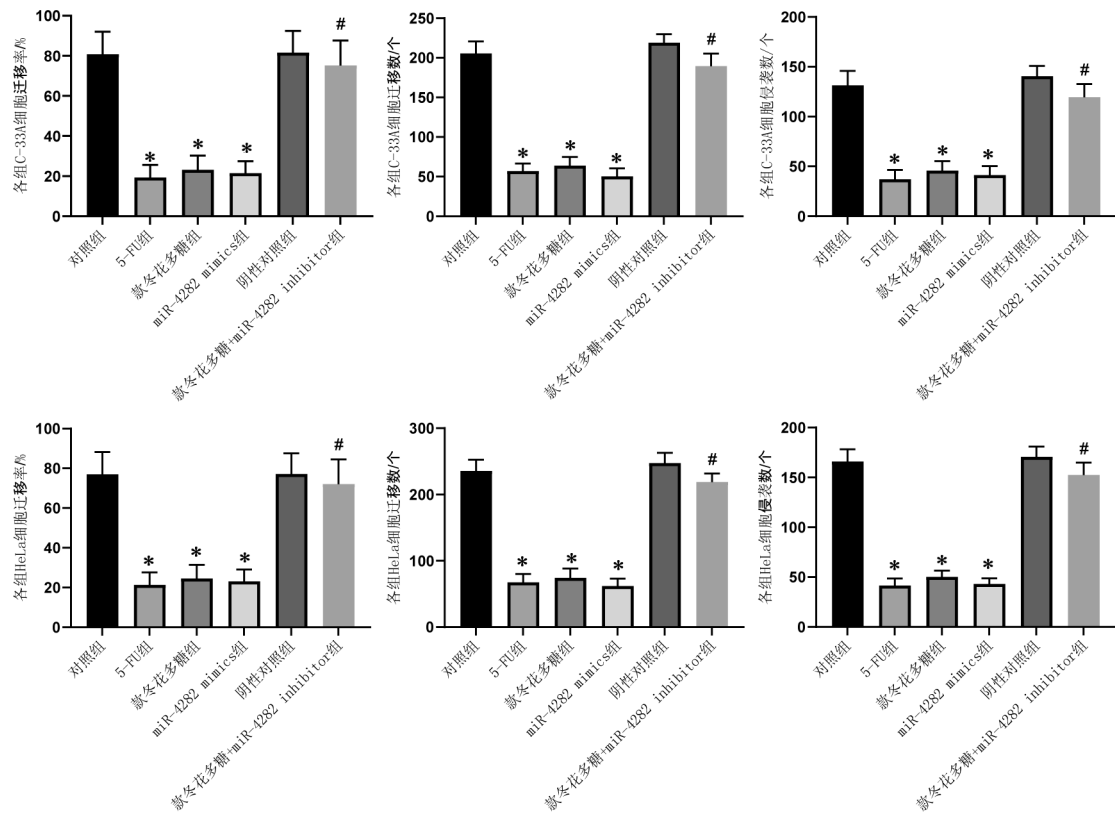


图9 各组HeLa和C-33A细胞迁移数、迁移率、侵袭数($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与款冬花多糖组相比,# $P < 0.05$ 。

bitor 组细胞 Cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达升高($P<0.05$), Bax 蛋白表达降低($P<0.05$)。详见图 10、图 11。

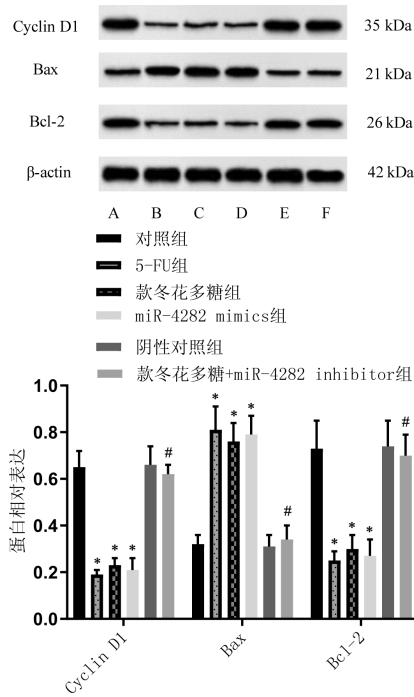


图 10 免疫印迹检测各组 HeLa 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达
注:A.对照组;B.5-FU 组;C.款冬花多糖组;D.miR-4282 mimics 组;E.阴性对照组;F.款冬花多糖+miR-4282 inhibitor 组。与对照组比较,* $P<0.05$;与款冬花多糖组相比,# $P<0.05$ 。

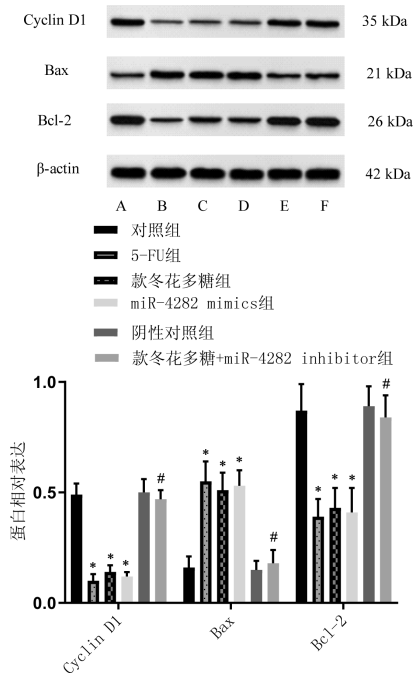


图 11 免疫印迹检测各组 C-33A 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达

注:A.对照组;B.5-FU 组;C.款冬花多糖组;D.miR-4282 mimics 组;E.阴性对照组;F.款冬花多糖+miR-4282 inhibitor 组。与对照组比较,* $P<0.05$;与款冬花多糖组相比,# $P<0.05$ 。

2.6 款冬花多糖对 HeLa 和 C-33A 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

与对照组相比,5-FU 组、款冬花多糖组、miR-4282 mimics 组细胞 Vimentin、MMP2、N-cadherin、SNAIL 蛋白表达降低($P<0.05$),E-cadherin 蛋白表达升高($P<0.05$);阴性对照组细胞 Vimentin、MMP2、N-cadherin、SNAIL、E-cadherin 蛋白表达无明显变化($P>0.05$)。与 5-FU 组相比,款冬花多糖组细胞 Vimentin、MMP2、N-cadherin、SNAIL、E-cadherin 蛋白表达无明显变化($P>0.05$)。与款冬花多糖组相比,款冬花多糖+miR-4282 inhibitor 组细胞 Vimentin、MMP2、N-cadherin、SNAIL 蛋白表达升高($P<0.05$),E-cadherin 蛋白表达降低($P<0.05$)。详见图 12、图13。

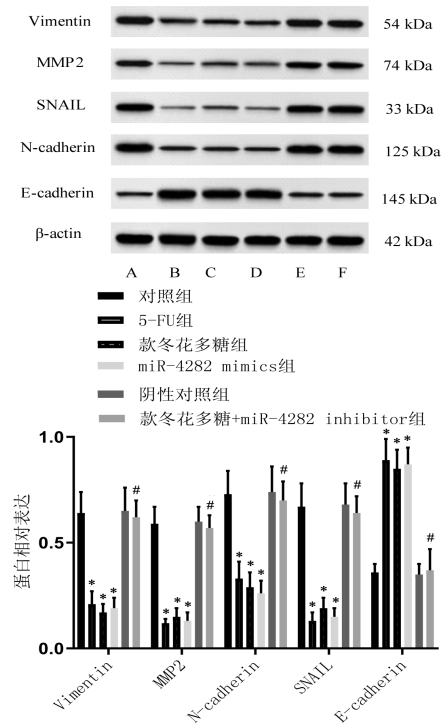


图 12 免疫印迹检测各组 HeLa 细胞 EMT 相关蛋白表达
注:A.对照组;B.5-FU 组;C.款冬花多糖组;D.miR-4282 mimics 组;E.阴性对照组;F.款冬花多糖+miR-4282 inhibitor 组。与对照组比较,* $P<0.05$;与款冬花多糖组相比,# $P<0.05$ 。

3 讨论

宫颈癌的致病因素包括遗传、病毒感染和环境等,但其致病机制目前还未得到明确阐释,如今手术切除、放化疗等宫颈癌治疗技术在不断发展和进步,虽然取得了一定成果,但患者生存率仍然较低。因此,积极开发更有效的新型治疗方法是提升患者预

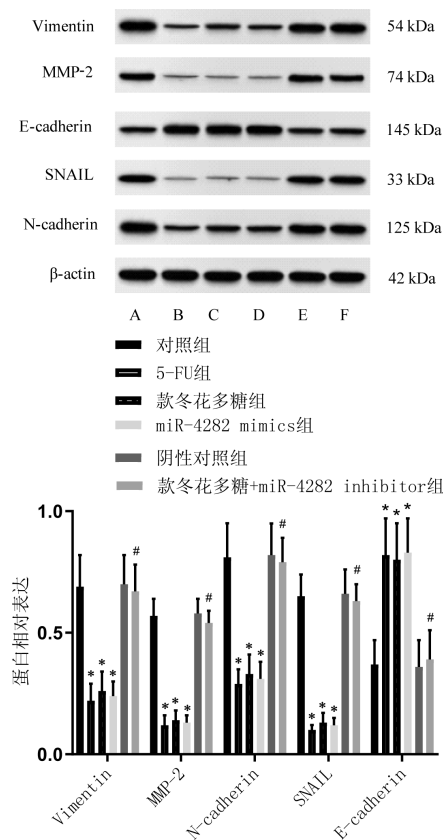


图 13 免疫印迹检测各组 C-33A 细胞 EMT 相关蛋白表达
注:A.对照组;B.5-FU组;C.款冬花多糖组;D.miR-4282 mimics组;
E.阴性对照组;F.款冬花多糖+miR-4282 inhibitor组。与对照组比
较,* $P<0.05$;与款冬花多糖组相比,# $P<0.05$ 。

后的关键^[12-13]。现代药理学研究显示,款冬花具有明显的抗癌功效,从款冬花中分离出的一种半萜类化合物可有效抑制三阴性乳腺癌细胞增殖和体内生长^[7,14]。另外很多研究证实,中药多糖具有多角度、多机制协同的抗肿瘤作用,还可避免耐药性的产生,在人类恶性肿瘤治疗中具有极大研究价值和开发潜力^[15]。CAO等^[16]的研究显示,款冬花多糖能显著降低结直肠癌细胞的增殖、迁移能力并促进其凋亡。QU等^[9]研究显示,款冬花多糖对肺癌细胞表现出抗增殖和促凋亡的作用,因而预测款冬花多糖可能对宫颈癌起到抑癌功效。本文结果显示,以款冬花多糖处理人宫颈癌细胞 HeLa 和 C-33A,可降低其细胞存活率、EDU 阳性率、迁移率、迁移数、侵袭数、Cyclin-D1 与 Bcl-2 蛋白表达,升高其凋亡率、Bax 蛋白表达,表明款冬花多糖可降低宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭能力并促进其凋亡,作用与阳性对照药 5-FU 相似。EMT 是癌症侵袭转移的必要生理过程,调控 EMT 标志蛋白 Vimentin、MMP-2、E-cadherin

表达,可通过调控 EMT 介导宫颈癌的迁移侵袭^[17],以款冬花多糖处理人宫颈癌细胞 HeLa 和 C-33A,可降低其细胞 Vimentin、MMP-2 蛋白表达并升高 E-cadherin 蛋白表达,表明款冬花多糖可通过减轻 EMT 而抑制宫颈癌迁移侵袭,作用与阳性对照药 5-FU 相似,最终揭示款冬花多糖可对宫颈癌发挥显著抗癌作用。

miR-4282 是在癌症发生发展中起到关键调控作用的微小 RNA,可成为潜在的抗肿瘤药物靶点^[18]。ZHOU 等^[19]的研究显示 miR-4282 在乳腺癌中表达下调,对其过表达可抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。ZHANG 等^[20]的研究显示 miR-4282 微微一种肿瘤抑制因子在口腔鳞状细胞癌中表达降低,上调其表达可显著减轻口腔鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移、EMT 并增强其细胞凋亡,由此可知,miR-4282 能成为的潜在治疗靶点。本文结果显示,以款冬花多糖处理人宫颈癌细胞 HeLa 和 C-33A,可升高其 miR-4282 表达,另外以模拟物上调 HeLa 和 C-33A 细胞 miR-4282 表达,可对宫颈癌起到与款冬花多糖相似的抗癌作用,表明 miR-4282 是宫颈癌的潜在治疗靶点,并可参与介导款冬花多糖对宫颈癌细胞增殖、迁移侵袭的抑制作用。然而,本研究结果表明,抑制 miR-4282 表达将削弱款冬花多糖对宫颈癌细胞增殖、迁移侵袭的抑制作用,同时降低款冬花多糖的促凋亡能力,削弱其对宫颈癌细胞凋亡的增强作用,最终逆转其对宫颈癌的抗癌作用,揭示款冬花多糖抑制宫颈癌细胞增殖、迁移侵袭是通过上调 miR-4282 表达实现的。

综上所述,款冬花多糖可通过提高 miR-4282 表达而降低宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭能力,促进其凋亡,最终对宫颈癌发挥显著抗癌功效,本文为宫颈癌的临床治疗提供了新的候选药物,并对其临床治疗技术的开发改进起到一定积极意义。

参考文献

- [1] PERKINS R B, WENTZENSEN N, GUIDO R S, et al. Cervical cancer screening: A review[J]. JAMA, 2023, 330(6): 547-558.
- [2] KYRGIU M, MOSCICKI A B. Vaginal microbiome and cervical cancer[J]. Seminars in Cancer Biology, 2022, 86(Pt 3): 189-198.
- [3] PIÑA-SÁNCHEZ P. Human papillomavirus: Challenges and opportunities for the control of cervical cancer[J]. Archives of Med-

- ical Research, 2022, 53(8): 753-769.
- [4] LI X, HOU Y S. MiR-4282 contributes to inhibit pancreatic cancer metastasis by negatively interacting with ABCB5[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2020, 24(19): 9915-9923.
- [5] ZUO Y, LIU C Y, TANG Q, et al. MiR-4282 is a tumor-suppressor gene for preventing metastasis of epithelial ovarian cancer by negatively regulating MIER1[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2021, 25(22): 6844-6852.
- [6] ZHAO J, JIANG G Q. MiR-4282 inhibits proliferation, invasion and metastasis of human breast cancer by targeting Myc[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(24): 8763-8771.
- [7] 林鑫, 李成义, 贾妙婷, 等. 款冬花化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(5): 131-140.
- [8] YU S T, LI J, GAO W, et al. Uncovering the anticancer mechanism of petroleum extracts of Farfaraeflos against Lewis lung cancer by metabolomics and network pharmacology analysis[J]. Biomedical Chromatography, 2020, 34(9): e4878.
- [9] QU H L, YANG W, LI J. Structural characterization of a polysaccharide from the flower buds of Tussilagofarfara, and its effect on proliferation and apoptosis of A549 human non-small lung cancer cell line[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113: 849-858.
- [10] 刘宜峰, 杨华, 曹磊, 等. 款冬花多糖通过调控 miR-99a/PI3K/Akt 通路影响食管癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. 中成药, 2020, 42(8): 2161-2165.
- [11] 孙佳良, 王佳, 薛新文, 等. 山奈酚阻滞 JAK2/STAT3 通路抑制宫颈癌细胞的增殖及糖酵解的作用研究[J]. 药物生物技术, 2023, 30(4): 368-373.
- [12] RAN Z H, WU S B, MA Z, et al. Advances in exosome biomarkers for cervical cancer[J]. Cancer Medicine, 2022, 11(24): 4966-4978.
- [13] POLGÁR C, MAJOR T, VARGA S. Radiotherapy and radio-chemotherapy of cervical cancer[J]. Magyar Onkologia, 2022, 66(4): 307-314.
- [14] JANG H, KO H, SONG K, et al. A sesquiterpenoid from farfaraeflos induces apoptosis of MDA-MB-231 human breast cancer cells through inhibition of JAK-STAT3 signaling[J]. Biomolecules, 2019, 9(7): 278.
- [15] 周艾玲, 王段珩, 岳晓蕾, 等. 中药多糖抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(16): 236-246.
- [16] CAO J H, QIN X M, LI Z Y. Synthesis of silver nanoparticles from the polysaccharide of farfaraeflos and uncovering its anticancer mechanism based on the cell metabolomic approach[J]. Journal of Proteome Research, 2022, 21(1): 172-181.
- [17] DENG B Y, ZHANG S Y, ZHOU Y Y, et al. PLAC8 contributes to the malignant behaviors of cervical cancer cells by activating the SOX4-mediated AKT pathway[J]. Histochemistry and Cell Biology, 2023, 159(5): 439-451.
- [18] ABBAS S Z, QADIR M I, MUHAMMAD S A. Systems-level differential gene expression analysis reveals new genetic variants of oral cancer[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 14667.
- [19] ZHOU M F, WANG W, WANG L, et al. LINC00536 knock-down inhibits breast cancer cells proliferation, invasion, and migration through regulation of the miR-4282/centromere protein F axis[J]. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2022, 38(11): 1037-1047.
- [20] ZHANG Y, ZHANG Z B, HUANG W L, et al. MiR-4282 inhibits tumor progression through down-regulation of ZBTB2 by targeting LIN28B in oral squamous cell carcinoma[J]. Journal of Cellular Physiology, 2020, 235(11): 8035-8047.

(本文编辑 苏维)