

本文引用: 王 锻, 周 莉. 蜂斗菜素调控 circSETDB1/miR-345-5p 对肝癌细胞生物学行为的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(11): 2014-2023.

蜂斗菜素调控 circSETDB1/miR-345-5p 对肝癌细胞生物学行为的影响

王 锻^{1*}, 周 莉²

1. 西北大学第一医院药学部, 陕西 西安 710043; 2. 河北中医药大学药剂学教研室, 河北 石家庄 050200

[摘要] **目的** 本研究旨在评估蜂斗菜素对肝细胞癌细胞系 2 (hepatocellular carcinoma cell line 2, HepG2) 的抗肿瘤活性, 并探讨蜂斗菜素通过调控环状 SET 结构域蛋白 1 (circular RNA SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1, circSETDB1) 和微小 RNA-345-5p (microRNA-345-5p, miR-345-5p) 的 mRNA 表达对细胞增殖、凋亡和迁移的影响。**方法** 将 HepG2 细胞分为多个处理组。对照组不做任何处理; 蜂斗菜素处理包括蜂斗菜素 L 组 (25 mol/L)、蜂斗菜素 M 组 (50 mol/L)、蜂斗菜素 H 组 (100 mol/L)、蜂斗菜素组 (100 mol/L); siRNA 干扰包含环状 SET 结构域蛋白 1 小干扰 RNA (small interfering RNA targeting circular SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1, si-circSETDB1) 组、小干扰 RNA 阴性对照 (small interfering RNA negative control, si-NC) 组; 过表达环状 SET 结构域蛋白 1 过表达质粒 (overexpression vector for circular SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1, pcDNA-circSETDB1) 组和蜂斗菜素+pcDNA-circSETDB1 组。采用 qRT-PCR 检测肝癌组织及癌旁组织的 circSETDB1 和 miR-345-5p 的 mRNA 表达水平; CCK-8 检测细胞增殖活性; 流式细胞术检测细胞凋亡情况; Western blot 检测半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3 (cleaved cysteinyl aspartate-specific proteinase-3, Cleaved-Caspase-3) 蛋白表达水平; 克隆形成实验检测细胞集落形成; 划痕实验和 Transwell 实验分别检测细胞愈合率和迁移; 双荧光素酶报告基因实验验证 circSETDB1 与 miR-345-5p 的靶向关系。**结果** 与癌旁组织相比, 肝癌组织中 circSETDB1 mRNA 表达升高 ($P<0.05$), miR-345-5p mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。与对照组相比, 蜂斗菜素各剂量组 HepG2 细胞的细胞活性、集落形成数降低 ($P<0.05$), 细胞凋亡率和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 且呈剂量依赖性 ($P<0.05$)。与 si-NC 组相比, si-circSETDB1 组 HepG2 细胞的 circSETDB1 表达、细胞活性、集落形成数、迁移细胞数和划痕愈合率降低 ($P<0.05$), miR-345-5p 表达、细胞凋亡率和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与蜂斗菜素组相比, 蜂斗菜素+pcDNA-circSETDB1 组 HepG2 细胞中 circSETDB1 表达、细胞活性、集落形成数、迁移细胞数和划痕愈合率升高 ($P<0.05$), miR-345-5p 表达、细胞凋亡率和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。**结论** 蜂斗菜素可抑制肝癌细胞 HepG2 增殖和迁移, 并诱导细胞凋亡, 其机制可能与抑制 circSETDB1 表达而上调 miR-345-5p 表达有关。

[关键词] 蜂斗菜素; 肝癌; circSETDB1; miR-345-5p; 细胞增殖; 凋亡; 迁移

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.11.011

Effects of petasin on the biological behaviors of hepatocellular carcinoma cells by regulating circSETDB1/miR-345-5p

WANG Duan^{1*}, ZHOU Li²

1. Department of Pharmacy, Northwest University First Hospital, Xi'an, Shanxi 710043, China; 2. Pharmaceutical Science Research Laboratory, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei 050200, China

[收稿日期] 2024-04-17

[基金项目] 河北省自然科学基金项目 (H2020423006)。

[通信作者] * 王 锻, 女, 硕士, 主管药师, E-mail: wangduan029@163.com。

[Abstract] Objective To evaluate the anti-tumor activity of petasin on hepatocellular carcinoma cell line 2 (HepG2) and to investigate its effects on cell proliferation, apoptosis, and migration by regulating the mRNA expressions of circular RNA SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1 (circSETDB1) and microRNA-345-5p (miR-345-5p). **Methods** Except for control group which received no treatment, HepG2 cells were additionally divided into multiple treatment groups, including petasin L (25 $\mu\text{mol/L}$), petasin M (50 $\mu\text{mol/L}$), and petasin H (100 $\mu\text{mol/L}$) groups, as well as small interfering RNA targeting circular SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1 (si-circSETDB1) group, small interfering RNA negative control (si-NC) group, overexpression vector for circular SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1 (pcDNA-circSETDB1) group, petasin+pcDNA-circSETDB1 group, and petasin group (100 $\mu\text{mol/L}$). The mRNA expression levels of circSETDB1 and miR-345-5p in hepatic cancerous tissues and paracancerous tissues were measured by qRT-PCR. Cell proliferation activity was measured using CCK-8, and apoptosis was assessed by flow cytometry. The protein expression level of cleaved cysteinyl aspartate-specific proteinase-3 (Cleaved-Caspase-3) was determined by Western blot. Cell colony formation was assessed using the clone formation assay. Cell wound healing rate and migration were checked by wound healing assay and Transwell assay, respectively. A dual-luciferase reporter assay was performed to validate the targeting relationship between circSETDB1 and miR-345-5p. **Results** Compared with paracancerous tissues, the circSETDB1 mRNA expression was higher ($P<0.05$) while miR-345-5p mRNA expression was lower ($P<0.05$) in hepatic cancerous tissues. Compared with control group, the cell viability and number of colonies of HepG2 cells in the petasin L, M, and H groups were lower, while the apoptosis rate and Cleaved-Caspase-3 protein expression were higher ($P<0.05$), in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Compared with si-NC group, the circSETDB1 expression, cell viability, number of cell colonies and migrated cells, and wound healing rate were lower ($P<0.05$), while the miR-345-5p expression, apoptosis rate, and Cleaved-Caspase-3 protein expression were higher in the si-circSETDB1 group of HepG2 cells ($P<0.05$). Compared with petasin group, the circSETDB1 expression, cell viability, number of cell colonies and migrated cells, and wound healing rate were higher ($P<0.05$), while the miR-345-5p expression, apoptosis rate, and Cleaved-Caspase-3 protein expression were lower in the petasin+pcDNA-circSETDB1 group of HepG2 cells ($P<0.05$). **Conclusion** Petasin can inhibit the proliferation and migration of HepG2 cells and induce the apoptosis, possibly by downregulating circSETDB1 expression and upregulating miR-345-5p expression.

[Keywords] petasins; hepatocellular carcinoma; circular RNA SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1; microRNA-345-5p; cell proliferation; apoptosis; migration

肝癌病情严重且预后极差,极大程度影响患者的生存质量^[1]。目前,肝癌的治疗手段包括根治性手术、放化疗及靶向药物治疗^[2]。然而,肝癌细胞对化学药物治疗的敏感性极低,可能导致患者出现原发性耐药。因此,探索高效且安全的新药物对改善肝癌预后具有重要意义^[3]。蜂斗菜素主要来源于蜂斗菜属植物掌叶蜂斗菜(*Petasites tatewakianus*)和毛裂蜂斗菜(*Petasites tricholobus*)。蜂斗菜具有清热解毒、活血化瘀的功效,其根茎提取物常用于治疗偏头痛、哮喘、变应性鼻炎等疾病^[4]。现代研究表明,蜂斗菜素具有抗炎、抗肿瘤和抗过敏等生物活性,蜂斗菜素可能通过促进细胞中 p53 蛋白表达及抑制细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinases 1/2, ERK1/2)磷酸化水平,从而抑制胃癌细胞增殖和细胞周期进程及诱导胃癌细胞凋亡^[5]。蜂斗菜素可通过抑制蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(protein kinase B/mammalian target of rapamycin, Akt/mTOR)信号传导通路,抑制结肠癌细胞恶性生物学

行为^[6]。目前,蜂斗菜素对肝癌细胞的恶性生物学行为的影响尚未明确。

环状 RNA(circular RNA, circRNA)和微小RNA(microRNA, miRNA)可靶向结合靶基因后抑制表达而影响靶基因功能,可调控细胞增殖、分化、物质代谢等多种生理反应,在恶性肿瘤的发病机制中扮演重要角色^[7-8]。环状 SET 结构域蛋白 1(circular RNA SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1, circSETDB1)是由 1 号染色体上的组蛋白赖氨酸 N 端甲基转移酶 SET 结构域分支型 1(SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1, SETDB1)形成的闭合环状 RNA,与多种恶性肿瘤的发病机制密切相关。研究表明,肺腺癌患者血清 circSETDB1 含量升高,血清 circSETDB1 含量与疾病发展阶段密切相关;低氧诱导的肺腺癌细胞外泌体中 circSETDB1 表达上调,敲低 circSETDB1 可抑制肺腺癌细胞的恶性表型,这可能与 circSETDB1 竞争性吸附微小 RNA-7(miRNA-7, miR-7)并正向调控

特异性蛋白 1(specificity protein 1, Sp1)表达有关^[9]。目前, circSETDB1 对肝癌细胞恶性生物学行为的影响尚未明确。研究显示, 下调微小 RNA-345-5p (microRNA-345-5p, miR-345-5p) 的 mRNA 表达可以增强肝癌细胞生长、侵袭和迁移能力, 并抑制肝癌细胞凋亡和自噬^[10]。半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(cleaved cysteinyl aspartate-specific proteinase, Cleaved-Caspase-3)是细胞凋亡过程中关键的执行酶之一, 其激活标志着细胞凋亡的发生^[11]。研究发现, 敲低胚胎发育相关基因 2(engrailed homeobox 2, EN2)后, 肝癌细胞的 Cleaved-Caspase-3 和 Cleaved-Caspase-9 蛋白水平显著升高, 伴随细胞凋亡率的增加^[12]。

因此, 本研究旨在探讨蜂斗菜素对肝癌细胞 HepG2 的增殖、凋亡和迁移的影响, 进一步研究其是否通过调控 circSETDB1 和 miR-345-5p 的表达发挥作用。通过系统实验为蜂斗菜素作为肝癌治疗的潜在药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选择 2020 年 1 月至 2022 年 1 月收治于西北大学第一医院的 57 例原发性肝细胞癌患者为研究对象, 样本分为肝癌组织组和癌旁组织组。其中肝癌组织组 57 例(男性 30 例、女性 27 例; 年龄 48.6 ± 7.2 岁; I~II 期 36 例, III~IV 期 21 例); 癌旁组织组 57 例(每例患者手术或病理过程中获取的与肝癌组织配对的相邻正常肝组织)。两组样本一般临床资料比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。本研究经西北大学第一医院伦理委员会审核批准(伦理审批号: LLSNCH20190024)。

1.2 主要试剂

肝细胞癌细胞系 2(hepatocellular carcinoma cell line 2, HepG2)(武汉普诺赛生命科技有限公司, 批号: 2019023); 蜂斗菜素(陕西斯诺特生物技术有限公司, 批号: 2018456); CCK-8 试剂盒、双荧光素酶活性检测试剂盒(武汉科鹿生物科技有限责任公司, 批号: 2020115、2020121); Lipofectamine™ 2000 试剂盒(武汉回盛生物科技股份有限公司, 批号: 2020231); SYBR GreenER qPCR SuperMix 通用试剂盒(赛默飞

世尔科技公司, 批号: A1158-C); Cleaved-Caspase-3 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase primer, GAPDH)(武汉基因美生物科技有限公司, 批号: 2021344、2021045)。

1.3 主要仪器

PCR 仪器(美国 ABI 公司, 型号: HT9700); Transwell 小室(武汉艾美捷公司, 型号: AMJ-TW-24); 流式细胞仪(美国 BD 公司, 型号: FACSCanto II); 分光光度计(美国安捷伦公司, 型号: Cary 60 UV-Vis)。

2 方法

2.1 circSETDB1 和 miR-345-5p 的 mRNA 表达检测

采用 qRT-PCR 检测肝癌组织和癌旁组织 circSETDB1 和 miR-345-5p 的 mRNA 表达。用 Trizol 试剂提取肝癌组织、癌旁组织和各组细胞总 RNA, 用 miRcute miRNA 提取分离试剂盒提取 miRNA。然后用 MLV 逆转录酶或 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒从提取的 RNA 合成 cDNA。

qRT-PCR 反应使用 SYBR GreenER qPCR SuperMix 通用试剂盒, 并在 PCR 仪上进行。引物序列: circSETDB1 正向引物 5'-TCCTGTGAAGCCTGAAGGAC-3', 反向引物 5'-TTAGTTGATGGCAGGCACAC-3', 引物长度 145 bp; GAPDH 正向引物 5'-AAAATCAAGTGGGGCGATGC-3', 反向引物 5'-GATGACCTTTTGGCTCCCC-3', 引物长度 224 bp; miR-345-5p 正向引物 5'-TGAGGGGACAGAGCGAGACTTT-3', 反向引物 5'-CTCAACTGGTGTCTGTGA-3', 引物长度 219 bp; U6 小核 RNA(U6 small nuclear RNA primer, U6) 正向引物 5'-ACCCTGAGAAATACCCTCACAT-3', 反向引物 5'-GACGACTGAGCCCCTGATG-3', 引物长度 187 bp。PCR 体系为 25 L, 总共进行 28 个循环, 最后一轮延伸 8 min。以 U6 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 circSETDB1、miR-345-5p 相对表达量。

2.2 HepG2 细胞培养和转染

HepG2 细胞完全培养基成分为 10% 胎牛血清及 90% DMEM。将对数生长期 HepG2 接种并完全培养基培养 24 h, 根据转染试剂操作说明将环状 SET 结构域蛋白 1 小干扰 RNA(small interfering RNA targeting circular SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1, si-circSETDB1)、小干扰 RNA

阴性对照(small interfering RNA negative control, si-NC)、环状 SET 结构域蛋白 1 过表达质粒(overexpression vector for circular SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1, pcDNA-circSETDB1)分别转染至 HepG2 细胞,转染 12 h 后更换完全培养基培养 24 h, qRT-PCR 检测 HepG2 细胞中 circSETDB1 表达计算转染效率。

2.3 细胞分组与处理

HepG2 细胞在未转染的情况下分为对照组和蜂斗菜素低剂量(L)、中剂量(M)、高剂量(H)组。对照组仅加入完全培养基,蜂斗菜素 L、M、H 组细胞分别用含 25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 蜂斗菜素的完全培养基处理 24 h。

转染 si-circSETDB1、si-NC 的 HepG2 细胞均用完全培养基培养 24 h, 记为 si-circSETDB1 组、si-NC 组。转染 pcDNA-circSETDB1 的 HepG2 细胞分别用完全培养基或含 100 $\mu\text{mol/L}$ 蜂斗菜素的完全培养基培养 24 h, 记为 pcDNA-circSETDB1 组、蜂斗菜素+pcDNA-circSETDB1 组。HepG2 细胞用含 100 $\mu\text{mol/L}$ 蜂斗菜素的完全培养基培养 24 h, 记为蜂斗菜素组。

2.4 细胞活性检测

采用 CCK-8 试剂检测细胞增殖活性。将 HepG2 细胞按照每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板中,接种体积 100 μL ,接种后培养 24 h。每组加入不同浓度的蜂斗菜素或转染特定的 siRNA、质粒处理 24 h。处理完成后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中孵育 4 h。使用酶标仪于 450 nm 波长下测量各孔的光密度(optical density, OD)值。OD 值越高,细胞代谢活性越强,细胞增殖越活跃。

2.5 细胞凋亡检测

HepG2 细胞于完全培养基中培养 24 h,胰酶消化后 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 1 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 5 min,收集细胞。弃上清液并将细胞重悬,用 Annexin V-FITC 和 PI 室温下避光孵育 10 min,再次重悬细胞,立即用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.6 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达检测

采用 Western blot 检测 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达。用蛋白提取试剂盒提取各组 HepG2 细胞总蛋

白,BCA 法定量后,取等量蛋白样品经凝胶电泳分离,用硝化纤维素膜进行湿转移。在脱脂乳中阻断后,用 Cleaved-Caspase-3、GAPDH 一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育膜过夜,用二抗(1:5 000)室温孵育 2 h。用 E-CL 检测信号,以 GAPDH 为内参,采用 Image J 图像分析软件计算 Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量。

2.7 细胞集落形成检测

采用克隆形成实验检测细胞集落形成。HepG2 细胞进行药物干预和质粒转染后,接种至 6 孔板(1 000 个/孔),每天更换培养基,每 2 天换液 1 次,连续处理 14 d 后洗涤去掉培养基,采用结晶紫染色后显微镜下观察,计算细胞集落形成数。

2.8 细胞划痕愈合率检测

采用划痕实验检测细胞划痕愈合率。HepG2 细胞接种在 6 孔板中(每孔 2×10^5 个细胞),用药物干预或转染质粒。当细胞几乎达到 100%融合后,使用 200 μL 移液器枪头划线,测量划痕间距(记为 d_{0h}),用无血清培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 h 后,再次测量细胞间间距(记为 d_{24h}),划痕愈合率= $(d_{0h}-d_{24h})/d_{0h} \times 100\%$ 。

2.9 细胞迁移检测

采用 Transwell 检测细胞迁移数目。HepG2 细胞于完全培养基中培育 24 h 后,将 1×10^5 个细胞悬浮于无血清 DMEM 培养基中,并加入 Transwell 小室的上腔。下腔中加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,作为化学引诱剂。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 24 h 后,移去上腔未迁移的细胞,用 4%多聚甲醛固定下腔细胞 20 min,并用 0.1%结晶紫染色 30 min。在光学显微镜下计数迁移细胞。

2.10 双萤光素酶报告基因实验

构建 circSETDB1 野生型萤光素酶报告基因载体(wild-type circSETDB1 luciferase reporter vector, WT-circSETDB1)、circSETDB1 突变型萤光素酶报告基因载体(mutant circSETDB1 luciferase reporter vector, MUT-circSETDB1)。HepG2 细胞分别共转染 WT-circSETDB1 与 miR-345-5p mimics、WT-circSETDB1 与微小 RNA 模拟对照序列(microRNA mimic negative control, miR-NC)、MUT-circSETDB1 与 miR-345-5p mimics、MUT-circSETDB1 与 miR-NC, 48 h 后用酶标仪检测萤光素酶活性,判断 circSET-

DB1 与 miR-345-5p 靶向关系。

2.11 统计学分析

采用 Sigmaplot 12.5 进行统计学分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,符合正态分布的两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间的比较采用单因素方差分析,并进行最小显著差异法事后检验。不符合正态分布的数据,采用 $Kruskal-Wallis$ 检验。采用 $Spearman$ 秩相关系数分析 circSETDB1 与 miR-345-5p 之间的表达关系。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肝癌组织和癌旁组织 circSETDB1、miR-345-5p 的 mRNA 表达比较

与癌旁组织组比较,肝癌组织组中 circSETDB1 mRNA 表达升高 ($P<0.05$),miR-345-5p mRNA 表达降低($P<0.05$)。详见表 1。

表 1 肝癌组织组和癌旁组织组 circSETDB1、miR-345-5p mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s, n=57$)

Table 1 Comparison of circSETDB1 and miR-345-5p mRNA expressions between hepatic cancerous tissue group and paracancerous tissue group ($\bar{x}\pm s, n=57$)

分组	circSETDB1	miR-345-5p
癌旁组织组	0.31±0.04 [△]	0.75±0.09 [△]
肝癌组织组	0.92±0.11	0.27±0.04

注:与癌旁组织组比较,[△] $P<0.05$ 。

3.2 蜂斗菜素对肝癌细胞 HepG2 增殖和凋亡的影响

与对照组比较,蜂斗菜素各剂量组肝癌细胞 HepG2 的细胞活性和集落形成数降低($P<0.05$),细胞凋亡率和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达升高($P<0.05$)。蜂斗菜素 L、M、H 组肝癌细胞 HepG2 的细胞活性、集落形成数的降低以及细胞细胞凋亡率、Cleaved-

Caspase-3 蛋白表达的升高呈剂量依赖性($P<0.05$)。详见图 1—2、表 2。

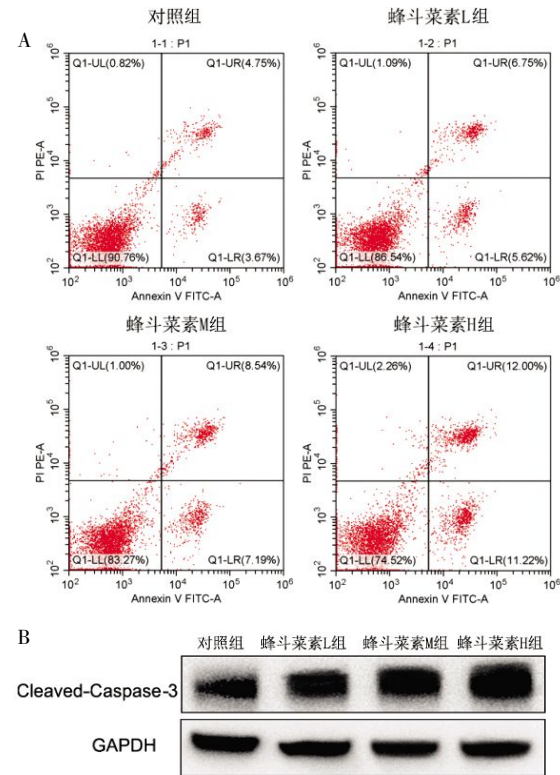


图 1 各组肝癌细胞 HepG2 增殖和凋亡率情况

Fig.1 Proliferation and apoptosis rates of HepG2 cells in each group

注:A.各组 HepG2 细胞凋亡率情况;B.各组 HepG2 细胞Cleaved-Caspase-3 蛋白的表达情况。

3.3 蜂斗菜素对肝癌细胞 HepG2 迁移能力的影响

与对照组比较,蜂斗菜素各剂量组的迁移细胞数和划痕愈合率降低($P<0.05$)。蜂斗菜素 L、M、H 组肝癌细胞 HepG2 的迁移细胞数和划痕愈合率降低呈剂量依赖性($P<0.05$)。详见图 3、表 3。

3.4 蜂斗菜素对肝癌细胞 HepG2 中 circSETDB1 和 miR-345-5p 的 mRNA 表达水平的影响

与对照组比较,蜂斗菜素各剂量组 circSETDB1

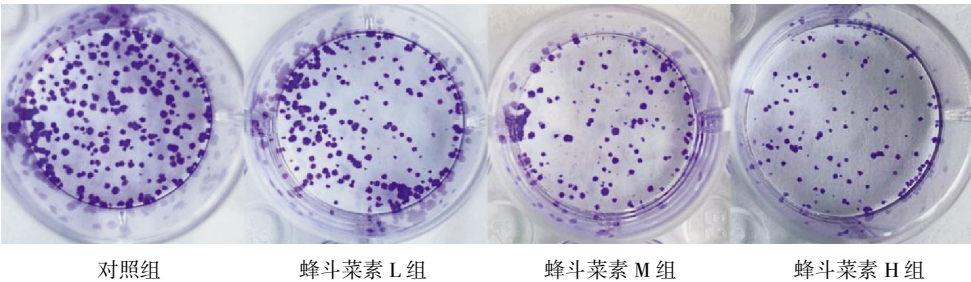


图 2 各组 HepG2 细胞集落形成水平比较(×200)

Fig.2 Comparison of colony formation levels of HepG2 cells among different groups (×200)

表 2 各组对肝癌细胞 HepG2 增殖和凋亡率比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Comparison of the proliferation and apoptosis rates of HepG2 cells among different groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	OD 值	集落形成数/个	细胞凋亡率/%	Cleaved-caspase-3
对照组	1.14±0.05	126.33±3.68	7.12±0.22	0.17±0.02
蜂斗菜素 L 组	0.97±0.04*	103.00±2.16*	12.33±0.34*	0.28±0.02*
蜂斗菜素 M 组	0.70±0.02* [#]	80.33±1.89* [#]	17.03±0.36* [#]	0.43±0.04* [#]
蜂斗菜素 H 组	0.49±0.03* ^{##}	59.33±1.25* ^{##}	23.54±0.71* ^{##}	0.68±0.04* ^{##}

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与蜂斗菜素 L 组相比,* $P<0.05$;与蜂斗菜素 M 组比较,* $P<0.05$ 。

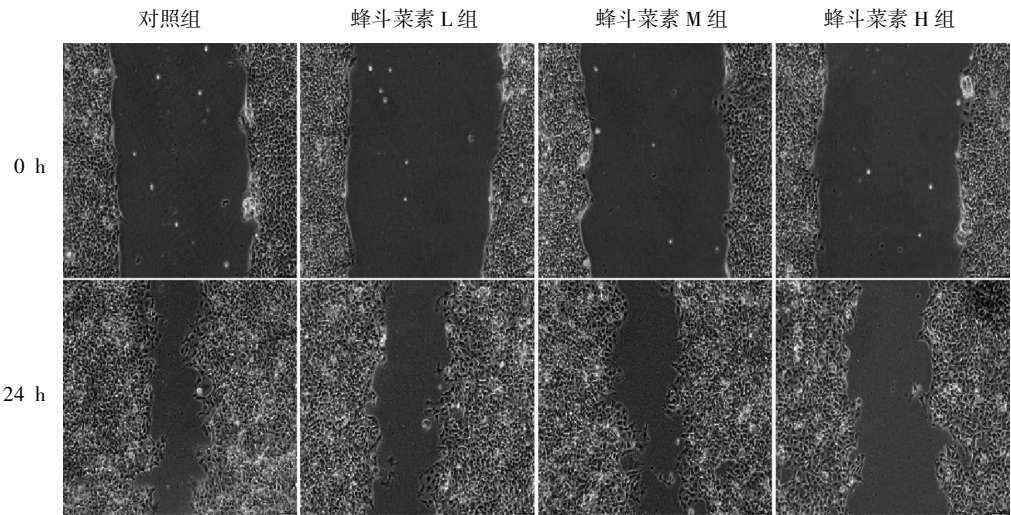


图 3 各组细胞划痕愈合水平比较($\times 100$)

Fig.3 Comparison of cell wound healing levels among different groups ($\times 100$)

表 3 蜂斗菜素对肝癌细胞 HepG2 迁移数和划痕愈合率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effects of petasin on the number of migrated cells and wound healing rate of HepG2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	迁移细胞数/个	划痕愈合率/%
对照组	151.00±4.55	68.02±2.31
蜂斗菜素 L 组	128.33±2.87*	56.24±1.21*
蜂斗菜素 M 组	98.33±2.05* [#]	44.09±1.07* [#]
蜂斗菜素 H 组	67.33±1.70* ^{##}	34.53±0.95* ^{##}

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与蜂斗菜素 L 组相比,* $P<0.05$;与蜂斗菜素 M 组比较,* $P<0.05$ 。

的 mRNA 表达水平降低($P<0.05$),miR-345-5p 表达升高($P<0.05$)。与蜂斗菜素 L、M、H 组 circSETDB1 表达降低和 miR-345-5p mRNA 表达升高呈剂量依赖性($P<0.05$)。详见表 4。

3.5 下调 circSETDB1 表达对 HepG2 增殖、凋亡和迁移水平的影响

与 si-NC 组比较,si-circSETDB1 组 circSETDB1 mRNA 表达、细胞活性、集落形成数、迁移细胞数和

表 4 蜂斗菜素对肝癌细胞 HepG2 中 circSETDB1 和 miR-345-5p 的 mRNA 表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effects of petasin on the mRNA expressions of circSETDB1 and miR-345-5p in HepG2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	circSETDB1	miR-345-5p
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00
蜂斗菜素 L 组	0.79±0.04*	1.39±0.04*
蜂斗菜素 M 组	0.46±0.03* [#]	1.91±0.07* [#]
蜂斗菜素 H 组	0.24±0.02* ^{##}	3.25±0.09* ^{##}

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与蜂斗菜素 L 组相比,* $P<0.05$;与蜂斗菜素 M 组比较,* $P<0.05$ 。

划痕愈合率降低($P<0.05$),miR-345-5p mRNA 表达、细胞凋亡率、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达升高($P<0.05$)。详见图 4—5、表 5。

3.6 上调 circSETDB1 表达对蜂斗菜素处理的 HepG2 增殖、凋亡和迁移水平的影响

与对照组比较,蜂斗菜素组 circSETDB1 的 mRNA 表达、细胞活性、集落形成数、迁移细胞数和划痕愈合率降低($P<0.05$),miR-345-5p mRNA 表达、细

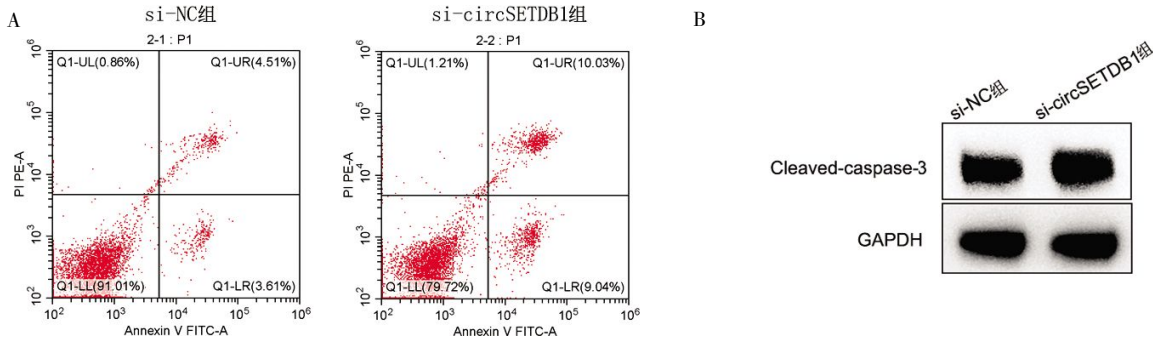


图 4 下调 circSETDB1 后肝癌细胞 HepG2 凋亡及 Cleaved-Caspase-3 的蛋白表达
Fig.4 Apoptosis and Cleaved-Caspase-3 protein expression of HepG2 cells after silencing circSETDB1

注: A. 两组 HepG2 细胞凋亡率情况; B. 两组 HepG2 细胞 Cleaved-Caspase-3 蛋白的表达情况。

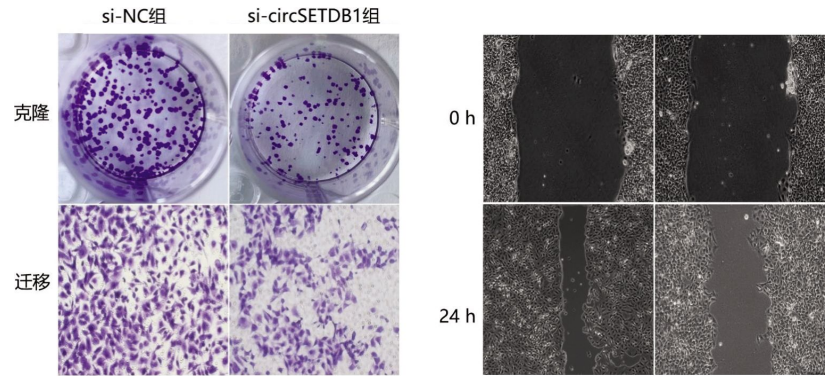


图 5 下调 circSETDB1 后 HepG2 克隆($\times 200$)、迁移($\times 100$)及划痕水平($\times 100$)比较
Fig.5 Comparison of colony formation ($\times 200$), migration($\times 100$), and wound healing ($\times 100$) levels of HepG2 cells after silencing circSETDB1

表 5 下调 circSETDB1 表达后 HepG2 细胞增殖、凋亡和迁移水平的比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Comparison of proliferation, apoptosis, and migration levels of HepG2 cells after downregulating circSETDB1 expression ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	circSETDB1	miR-345-5p	OD 值	集落形成数/个	细胞凋亡率/%	迁移细胞数/个	划痕愈合率/%	Cleaved-Caspase-3
si-NC 组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.14 $\pm$ 0.06	127.00 $\pm$ 3.56	7.12 $\pm$ 0.30	151.00 $\pm$ 3.27	67.71 $\pm$ 2.88	0.16 $\pm$ 0.02
si-circSETDB1 组	0.30 $\pm$ 0.03 ^Δ	2.67 $\pm$ 0.08 ^Δ	0.57 $\pm$ 0.03 ^Δ	65.00 $\pm$ 1.63 ^Δ	20.69 $\pm$ 0.67 ^Δ	74.67 $\pm$ 2.05 ^Δ	37.34 $\pm$ 0.96 ^Δ	0.57 $\pm$ 0.03 ^Δ

注: 与 si-NC 组比较, ^Δ $P < 0.05$ 。

胞凋亡率、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达升高($P < 0.05$)。与蜂斗菜素组比较, 蜂斗菜素+pcDNA-circSETDB1 组 circSETDB1 mRNA 表达、细胞活性、集落形成数、迁移细胞数和划痕愈合率升高($P < 0.05$), miR-345-5p mRNA 表达、细胞凋亡率、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达降低($P < 0.05$)。与蜂斗菜素+pcDNA-circSETDB1 组比较, pcDNA-circSETDB1 组的 circSETDB1 mRNA 表达、细胞活性、集落形成数、迁移

细胞数和划痕愈合率升高($P < 0.05$), miR-345-5p 的 mRNA 表达、细胞凋亡率、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达降低($P < 0.05$)。详见图 6—7、表 6。

3.7 circSETDB1 与 miR-345-5p 的靶向调控关系

共转染 WT-circSETDB1 与 miR-345-5p mimics 的细胞萤光素酶活性低于共转染 WT-circSETDB1 与 miR-NC 的 HepG2 细胞($P < 0.05$), 而共转染 MUT-circSETDB1、miR-345-5p mimics 与共转染

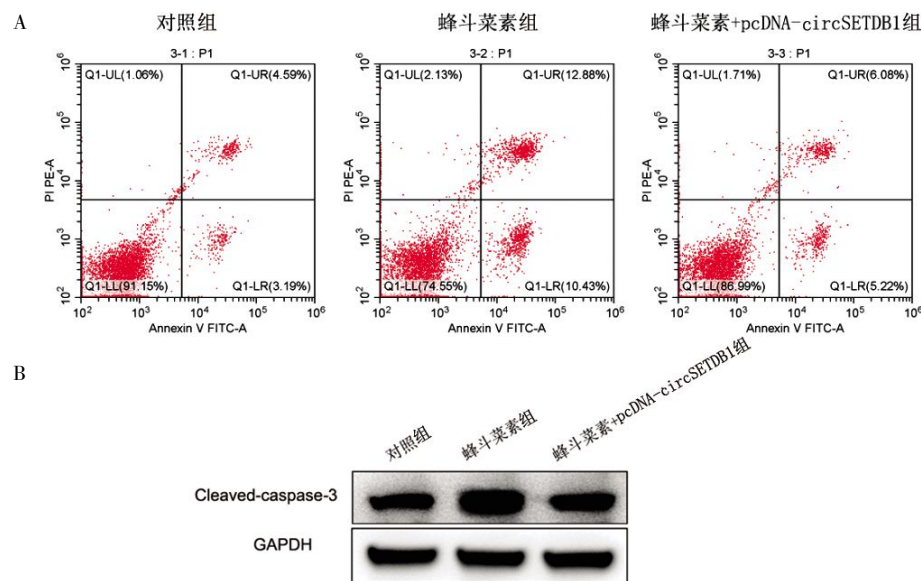


图 6 上调 circSETDB1 表达后蜂斗菜素处理的 HepG2 增殖、凋亡和迁移水平的比较

Fig.6 Comparison of proliferation, apoptosis, and migration levels of HepG2 cells treated with petasin after upregulating circSETDB1 expression

注:A.两组 HepG2 细胞凋亡率情况,B.各组 HepG2 细胞 Cleaved-Caspase-3 蛋白的表达情况。

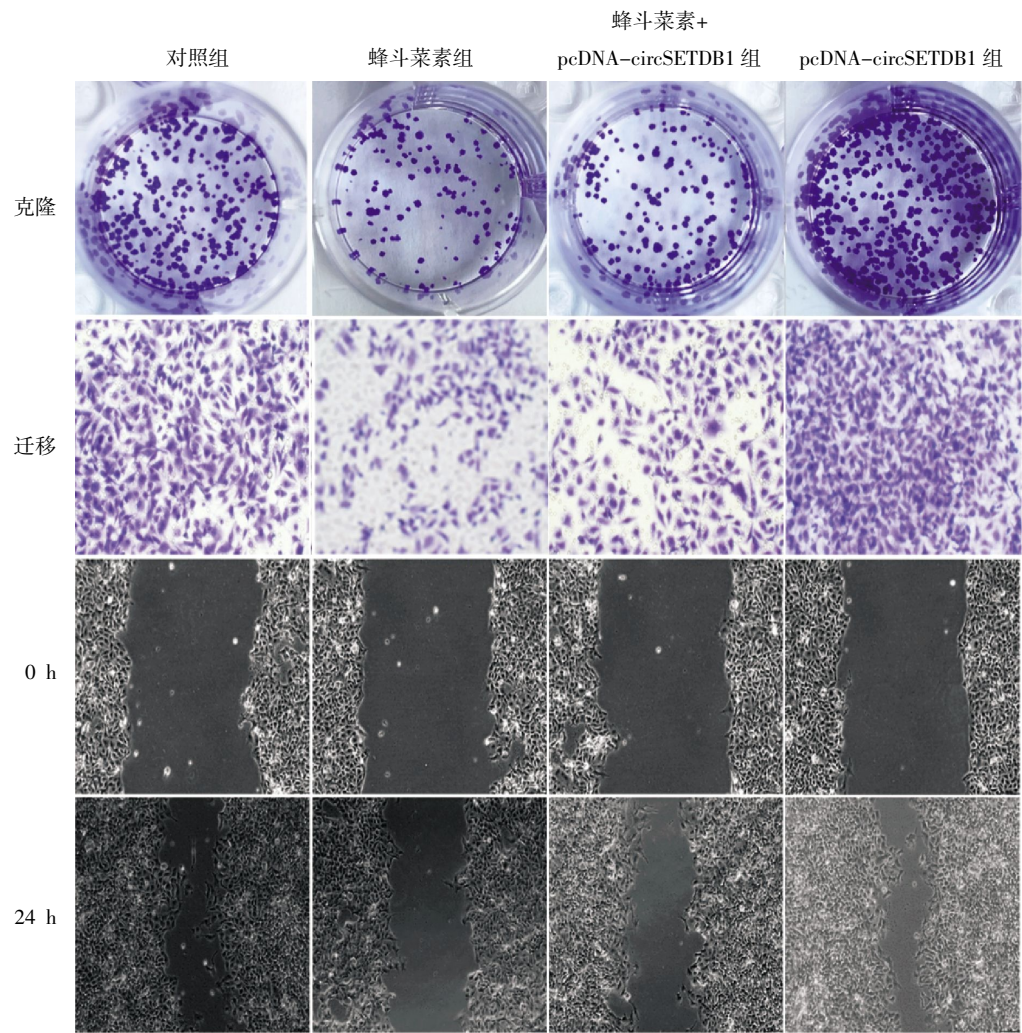


图 7 上调 circSETDB1 表达后蜂斗菜素处理的 HepG2 克隆($\times 200$)、迁移($\times 100$)及划痕水平($\times 100$)的比较

Fig.7 Comparison of colony formation ($\times 200$), migration ($\times 100$), and wound healing ($\times 100$) levels of HepG2 cells treated with petasin after upregulating circSETDB1 expression

表 6 上调 circSETDB1 表达后蜂斗菜素处理的 HepG2 增殖、凋亡和迁移水平的比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Comparison of proliferation, apoptosis, and migration levels of HepG2 cells treated with petasin after upregulating circSETDB1 expression ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	circSETDB1	miR-345-5p	OD 值	集落形成数/个	细胞凋亡率/%	迁移细胞数/个	划痕愈合率/%	Cleaved-Caspase-3
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.14±0.05	126.67±4.50	7.13±0.26	152.00±4.55	68.14±3.16	0.16±0.02
蜂斗菜素组	0.24±0.01*	3.25±0.07*	0.49±0.04*	59.67±2.05*	23.59±0.77*	67.33±1.25*	34.56±0.69*	0.69±0.04*
蜂斗菜素+pcDNA-circSETDB1 组	0.82±0.07 [▲]	1.35±0.05 [▲]	1.03±0.04 [▲]	105.67±3.30 [▲]	11.18±0.35 [▲]	132.67±3.86 [▲]	57.89±1.23 [▲]	0.25±0.02 [▲]
pcDNA-circSETDB1 组	1.43±0.09 ^{▲▲}	0.72±0.08 ^{▲▲}	1.28±0.05 ^{▲▲}	142.25±5.11 ^{▲▲}	5.31±0.47 ^{▲▲}	161.84±5.21 ^{▲▲}	71.25±3.18 ^{▲▲}	0.12±0.01 ^{▲▲}

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与蜂斗菜素组相比,[▲] $P<0.05$;与蜂斗菜素+pcDNA-circSETDB1组相比,^{▲▲} $P<0.05$ 。

MUT-circSETDB1、miR-NC 细胞萤光素酶活性差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 7。

表 7 萤光素酶活性检测结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Luciferase activity assay results ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	WT-circSETDB1	MUT-circSETDB1
miR-NC 组	1.03±0.09	1.02±0.09
miR-345-5p 组	0.36±0.04 [®]	0.98±0.08

注:与 miR-NC 组比较,[®] $P<0.05$ 。

4 讨论

肝癌发病机制尚未完全明确,目前因缺乏高效安全的药物而导致其疗效较差。在中医理论中,蜂斗菜具有清热解毒、活血化痰的功效。其用于治疗因热毒引发的疾病,如咳嗽和咽喉肿痛等,能够有效减轻炎症反应^[13]。中医学认为,血液循环不畅是多种疾病的根源,蜂斗菜素通过促进血液循环,有助于缓解疼痛并改善相关症状^[14]。此外,基于现有的研究推测,细胞凋亡与多种基因调控密切相关,circSETDB1 及 miR-345-5p 具有调控细胞增殖及凋亡功能^[15],蜂斗菜素可能对肝癌细胞具有一定的抑制作用。

本研究发现,在肝癌组织中,circSETDB1 的平均表达量高于癌旁组织。相反,miR-345-5p 在肝癌组织中的表达量低于癌旁组织,表明 circSETDB1 和 miR-345-5p 在肝癌发展中呈负相关关系。Caspase-3 受到上游信号激活后可磷酸化激活产生 Cleaved-Caspase-3,激活下游靶基因而产生细胞凋亡。本研究发现,蜂斗菜素处理可降低 HepG2 细胞的 OD 值,且呈剂量依赖性,说明蜂斗菜素可抑制肝癌细胞 HepG2 增殖和迁移,诱导肝癌细胞凋亡,其具有治

疗肝癌的潜在价值。本研究进一步发现,蜂斗菜素可促进肝癌细胞中 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达,推测蜂斗菜素可能通过促进 Caspase 级联反应诱导肝癌细胞凋亡并死亡。研究表明,circ102209、circ100084 和 circHIPK3 等多种 circRNA 在肝癌中异常表达,参与调控肝癌细胞恶性表型,为肝癌的治疗提供潜在分子靶点^[16-17]。circSETDB1 是近年来新发现的一种 circRNA,其在高级别浆液性卵巢癌患者血清中表达上调,且与患者 Figo 分期、淋巴结转移及生存期密切相关,可作为高级别浆液性卵巢癌诊断的生物标志物^[18]。

此外,本研究通过蜂斗菜素对肝癌细胞 HepG2 的作用,进一步验证了 circSETDB1 与 miR-345-5p 的关系。结果表明,蜂斗菜素能够显著抑制 HepG2 细胞的增殖和迁移,并诱导细胞凋亡,且呈现剂量依赖性。在蜂斗菜素作用下,肝癌细胞中 circSETDB1 的表达显著降低,而 miR-345-5p 的表达显著升高,表明 circSETDB1 可能通过调控 miR-345-5p 影响肝癌细胞的生物学行为。通过沉默 circSETDB1,本研究进一步探讨了其在肝癌中的具体作用。结果显示,circSETDB1 的沉默显著抑制了 HepG2 细胞的增殖和迁移,并促进细胞凋亡,表明 circSETDB1 可能通过调控多条信号通路参与肝癌的发生发展。此外,上调 circSETDB1 表达能够逆转蜂斗菜素对肝癌细胞的抑制作用,证明 circSETDB1 在肝癌中具有促癌作用。研究发现,抑制 miR-345-5p 表达可引起动力相关蛋白 1 的激活,进而促进乳腺癌侵袭和转移^[15],过表达 miR-345-5p 可靶向抑制扭转相关蛋白 1 的表达阻碍胆管癌细胞增殖、迁移、侵袭、上皮间质转化及血管生成,同时诱导胆管癌细胞凋亡^[19]。甲状腺乳

头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)组织中的 miR-345-5p 表达降低,转染 miR-345-5p 模拟物的 PTC 细胞活力及集落形成能力降低,而凋亡加剧,这与 miR-345-5p 靶向抑制 PTC 细胞中含 SET 域赖氨酸甲基转移酶 7(SET domain containing lysine methyltransferase 7, SETD7)表达有关,miR-345-5p/SETD7 轴为 PTC 的治疗提供了潜在分子靶点^[20]。研究显示,miR-345-5p 表达的上调可促进肝癌细胞凋亡,并增强肝癌细胞放射敏感性^[21]。

综上所述,circSETDB1 通过调控 miR-345-5p 表达,抑制肝癌细胞的增殖、凋亡和迁移能力,蜂斗菜素通过调控该通路展现出良好的抗癌潜力。在未来的临床治疗中,靶向 circSETDB1 的治疗手段可能成为肝癌治疗的新方向,因此,进一步探讨 circSETDB1 作为肝癌治疗靶点的临床应用具有重要意义。

参考文献

- [1] 郝运,李川,文天夫,等. 全球及中国的肝癌流行病学特征:基于《2022 全球癌症统计报告》解读[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2024, 31(7): 781-789.
- [2] 韩月晴,张语涵,刘嘉夫,等. 肝癌微环境重塑与免疫治疗策略[J/OL]. 生物化学与生物物理进展, 1-18[2024-03-23]. <https://doi.org/10.16476/j.pibb.2024.0335>.
- [3] 胡泽玉,杨清瑞,周钺,等. 肝癌化疗耐药机制及中药干预研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(14): 254-261.
- [4] 谢玲玲. 蜂斗菜素对宫颈癌细胞增殖、细胞周期和凋亡的影响[J]. 安徽医药, 2022, 26(5): 864-868.
- [5] 姚莉,武兴斌,秦龙. 蜂斗菜素对人胃癌 SGC7901 细胞增殖抑制和诱导凋亡作用[J]. 中成药, 2016, 38(10): 2263-2265.
- [6] LYU X, SONG A L, BAI Y L, et al. Inhibitory effects of petasin on human colon carcinoma cells mediated by inactivation of Akt/mTOR pathway[J]. Chinese Medical Journal, 2019, 132(9): 1071-1078.
- [7] 郭力维,李长天. 外泌体源性环状 RNA 在肝细胞癌发生发展中的作用机制及相关临床应用研究进展[J]. 甘肃中医药大学学报, 2023, 40(3): 98-102.
- [8] 袁浩桐,姜博文,李真鹏,等. 基于生物信息学构建肝细胞癌预后相关 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络[J]. 中国医科大学学报, 2023, 52(5): 413-419.
- [9] 杨茂辉,冉恒泉,王何斌,等. circMTHFD2 靶向 miR-2116-3p 对肝癌 Huh-7 细胞变迁的调控机制[J]. 医学研究与战创伤救治, 2023, 36(1): 69-76.
- [10] LIN S B, ZHUANG J, ZHU L P, et al. Matrine inhibits cell growth, migration, invasion and promotes autophagy in hepatocellular carcinoma by regulation of circ_0027345/miR-345-5p/HOXD3 axis[J]. Cancer Cell International, 2020, 20: 246.
- [11] 董兰,丁瑞雪,唐文静,等. 秋水仙碱通过调控 Bcl-2/Cleaved-caspase3 细胞凋亡途径改善异丙肾上腺素所致小鼠心肌损伤[J]. 遵义医科大学学报, 2022, 45(4): 427-432.
- [12] 杨启,万春,吕新远. 敲低 EN2 诱导肝癌细胞凋亡并提高 PTEN 蛋白的表达[J]. 肿瘤防治研究, 2019, 46(4): 316-321.
- [13] 吕西. 蜂斗菜素通过 PI3K-Akt-mTOR 信号通路抗结肠癌作用体外和体内实验研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2019.
- [14] 李炳锋. 蜂斗菜总内酯对缺血性脑卒中的神经保护作用及机制研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2024.
- [15] 张仕田,何翔,杨帆,等. circVAPA 调控 miR-345-5p/IL-6/STAT3 通路影响卵巢癌细胞增殖、迁移及侵袭的机制研究[J]. 中国妇产科临床杂志, 2024, 25(3): 278-279.
- [16] 蒋磊,李玉强,李男,等. 环状 RNA_102272 通过 miR-1258 调控肝癌细胞增殖[J]. 锦州医科大学学报, 2023, 44(4): 27-32.
- [17] 董辉,顾铃毓,俞梦楚,等. circRNA CCND1 对人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(8): 1-8.
- [18] 陈秀华,吴健晖,陈良,等. circRNA-PTPRM 靶向 miR-139-5p 调控肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的研究[J/OL]. 解放军医学院学报, 1-9[2024-03-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/10.1117.r.20240813.1723.004.html>.
- [19] ZHU C Y, FAN C R, ZHANG Y L, et al. LncRNA DANCER affected cell growth, EMT and angiogenesis by sponging miR-345-5p through modulating Twist1 in cholangiocarcinoma[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2020, 24(5): 2321-2334.
- [20] 李敬霞,刘艳. 槐定碱上调 miR-345-5p 对乳腺癌细胞 BT549 增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 新中医, 2022, 54(1): 128-133.
- [21] ZHANG Y H, HUANG B, CHEN Z, et al. Knockdown of LINC00473 enhances radiosensitivity in hepatocellular carcinoma via regulating the miR-345-5p/FOXPI axis[J]. OncoTargets and Therapy, 2020, 13: 173-183.

(本文编辑 田梦妍)