

本文引用: 胡忠源, 张成明, 鱼 涛. 雷公藤红素通过 miR-224-5p/EGR2 通路抑制胃癌 MGC803 细胞生物学行为的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(11): 2081–2089.

雷公藤红素通过 miR-224-5p/EGR2 通路抑制胃癌 MGC803 细胞生物学行为的作用机制

胡忠源, 张成明, 鱼 涛*

陕西省中医医院脾胃一科, 陕西 西安 710000

〔摘要〕 目的 探讨雷公藤红素(CL)对胃癌 MGC803 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响及其机制。方法 体外培养人胃癌 MGC803 细胞, 设立对照组、CL(0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$)组、微小RNA-224-5p(miR-224-5p)抑制组(miR-224-5p-i 组)、CL 联合 miR-224-5p 过表达组(CL+mimic 组)、CL 联合 si-EGR2 组(CL+si-EGR2 组)及 miR-224-5p 抑制联合 si-EGR2 组(miR-224-5p-i+si-EGR2 组)。通过 CCK-8 法、流式细胞术、Transwell 侵袭实验及划痕愈合实验评估细胞增殖、凋亡及迁移侵袭能力; RT-qPCR 及 Western blot 检测 miR-224-5p、早期生长反应因子 2(EGR2)及其下游蛋白细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、切割型胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达水平; 双荧光素酶报告实验验证 miR-224-5p 对 EGR2 的靶向调控关系。结果 与对照组相比, CL 处理后 MGC803 细胞活力、迁移细胞数、侵袭细胞数、划痕愈合率及 Cyclin D1、MMP-9 蛋白表达水平降低($P<0.01$), 凋亡率及 EGR2、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平升高($P<0.01$); miR-224-5p 表达下调($P<0.01$)。双荧光素酶实验结果证实, miR-224-5p 可特异性结合 EGR2 3'UTR 区调控其表达。与 CL 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, CL+mimic 组细胞活力、划痕愈合率及 Cyclin D1、MMP-9 蛋白表达升高($P<0.05$), 凋亡率及 EGR2、cleaved Caspase-3 蛋白表达降低($P<0.05$)。与 miR-224-5p-i 组比较, miR-224-5p-i+si-EGR2 组细胞活力、划痕愈合率及 Cyclin D1、MMP-9 表达升高($P<0.05$), 凋亡率及 EGR2、cleaved Caspase-3 表达降低($P<0.05$)。结论 CL 可通过下调 miR-224-5p 表达, 解除其对 EGR2 的抑制, 进而抑制胃癌 MGC803 细胞增殖与侵袭, 诱导凋亡。

〔关键词〕 胃癌; 微小 RNA-224-5p; 早期生长反应因子 2; 增殖; 凋亡; 侵袭

〔中图分类号〕 R285

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.11.008

Mechanism of action of celastrol inhibiting biological behaviors of gastric cancer MGC803 cells via the miR-224-5p/EGR2 pathway

HU Zhongyuan, ZHANG Chengming, YU Tao*

The First Department of Spleen and Stomach Diseases, Shaanxi Provincial Hospital of Chinese Medicine,

Xi'an, Shaanxi 710000, China

〔Abstract〕 Objective To investigate the effects of celastrol (CL) on the proliferation, apoptosis, and invasion of gastric cancer MGC803 cells and its underlying mechanism. **Methods** Human gastric cancer MGC803 cells were cultured in vitro and divided into control group, CL (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{mol/L}$) groups, miR-224-5p inhibitor group (miR-224-5p-i group), CL combined with miR-

〔收稿日期〕 2025-05-08

〔基金项目〕 陕西省重点研发计划项目(2024SF-YBXM-499)。

〔通信作者〕 * 鱼 涛, 男, 硕士, 主任医师, E-mail: 13519178501@163.com。

224-5p overexpression group (CL+mimic group), CL combined with si-EGR2 group (CL+si-EGR2 group), and miR-224-5p inhibitor combined with si-EGR2 group (miR-224-5p-i+si-EGR2 group). Cell proliferation, apoptosis, migration and invasion capacities were assessed using the CCK-8 assay, flow cytometry, Transwell invasion assay, and scratch wound healing assay respectively. The expression levels of miR-224-5p, early growth response 2 (EGR2), and its downstream proteins Cyclin D1, Cleaved Caspase-3, and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were measured by RT-qPCR and Western blot. The targeting relationship between miR-224-5p and EGR2 was verified using a dual-luciferase reporter assay. **Results** Compared with the control group, CL treatment resulted in reduced cell viability, number of migrating and invading cells, scratch wound healing rate, and the protein expression levels of Cyclin D1 and MMP-9 in MGC803 cells ($P<0.01$), while it increased the apoptosis rate and the protein expression levels of EGR2 and Cleaved Caspase-3 ($P<0.01$), and decreased the expression level of miR-224-5p ($P<0.01$). The dual-luciferase reporter assay confirmed that miR-224-5p specifically binds to the 3'UTR region of EGR2 to regulate its expression. Compared with the CL 2.0 $\mu\text{mol/L}$ group, the CL+mimic group exhibited increased cell viability, scratch wound healing rate, and protein expression levels of Cyclin D1 and MMP-9 ($P<0.05$), while the apoptosis rate and protein expression levels of EGR2 and Cleaved Caspase-3 decreased ($P<0.05$). Compared with the miR-224-5p-i group, the miR-224-5p-i+si-EGR2 group showed elevated cell viability, scratch wound healing rate, and expression levels of Cyclin D1 and MMP-9 ($P<0.05$), along with reduced apoptosis rate and expression levels of EGR2 and Cleaved Caspase-3 ($P<0.05$). **Conclusion** CL can inhibit the proliferation and invasion of MGC803 gastric cancer cells and induce apoptosis by downregulating miR-224-5p expression and relieving its inhibitory effects on EGR2.

[**Keywords**] gastric cancer; miRNA-224-5p; early growth response factor 2; proliferation; apoptosis; invasion

胃癌(gastric cancer, GC)是全球常见的消化系统恶性肿瘤之一,早期症状隐匿,确诊时多已进入中晚期,严重威胁患者生命健康^[1]。目前,胃癌的主要治疗方式包括手术切除、化疗及靶向治疗,但由于肿瘤的耐药性及复发性,治疗效果仍不理想^[2]。因此,深入探讨其发病机制并寻找新的治疗靶点,具有重要的临床意义。近年来,天然药物因其多靶点、低毒副作用等优势,在抗癌研究中受到广泛关注。雷公藤红素(Celastrol, CL)是从中药南蛇藤中提取的三萜类化合物,已有研究证实其在乳腺癌、肝癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤中具有显著的抗增殖、促凋亡和抑制迁移作用^[3]。CL可通过调控细胞周期、氧化应激反应以及磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等多条信号通路发挥其抗肿瘤效应,但其在胃癌中的分子机制尚未完全明确^[3-5]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类非编码 RNA,微小RNA-224-5p(miRNA-224-5p, miR-224-5p)作为多种实体瘤中异常表达的重要 miRNA,在肝癌、结直肠癌、甲状腺癌等中被证实具有促进肿瘤增长特性,能调节细胞增殖、凋亡、侵袭等过程^[6]。研究发现,miR-224-5p 在胃癌中高表达,其沉默可有效

抑制胃癌细胞的恶性生物学特性^[6]。但目前关于 CL 是否可通过调控 miR-224-5p 发挥抗胃癌作用的研究尚缺乏。生物信息学预测显示,miR-224-5p 与早期生长反应因子 2(early growth response 2, EGR2)有结合位点^[5]。研究显示,敲除 EGR2 表达可促进胃癌细胞增殖,并抑制细胞凋亡^[6]。因此,本研究通过体外实验探讨 CL 对胃癌 MGC803 细胞增殖、凋亡及侵袭的影响,重点考察其是否通过调控 miR-224-5p 及其下游靶基因 EGR2 发挥抗肿瘤作用,旨在为胃癌的分子靶向治疗提供新的思路和实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

胃癌细胞系 MGC803 购自中国科学院上海细胞库(批号:CB-MGC803-021);CL(分子式: $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{O}_4$,分子量:450.61,纯度 $\geq 98\%$,批号:DEG0013)购自南京狄尔格医药科技有限公司;miR-224-5p 抑制质粒(miR-224-5p-i)及阴性对照质粒(anti-miR-NC)、miR-224-5p 过表达质粒(miR-224-5p mimics)及阴性对照质粒(miR-NC)、miR-224-5p 及 U6 引物均购自广州锐博生物科技有限公司;Trizol 试剂(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号:K1622);双荧光素酶报告基因检测试剂盒、SYBR Green 一步法荧

光定量 PCR 试剂盒、CCK-8 试剂盒(中国碧云天生物科技有限公司,批号:RG027、D7268M、C0037);细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、胱天蛋白酶-3(cysteine aspartic acid specific protease-3, Caspase-3)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、切割型胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)、EGR2 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:26939-1-AP、82707-13-RR、10375-2-AP、25128-1-AP、13491-1-AP);Lipofectamine™ 3000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司,批号:L3000-015);基质胶、Transwell 小室(美国 Corning 公司,货号:356234、3422)。

1.2 主要仪器

荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司,型号:Prism® 7500);多功能酶标仪(美国 Bio-Rad Laboratories 公司,型号:iMark™ 680);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司,型号:FACSCalibur);电泳仪及转膜系统(美国 Bio-Rad Laboratories 公司,型号:17001915);倒置显微镜(日本 Olympus Corporation 公司,型号:IX73);凝胶成像分析系统(中国天能生命科学有限公司,型号:Tanon 5200);恒温培养箱(德国 Thermo Fisher Scientific 公司,型号:Heraeus 150i GP);超净工作台(中国苏净集团有限公司,型号:VS-1300U);台式离心机(德国 Eppendorf AG 公司,型号:5424R)。

1.3 方法

1.3.1 细胞处理 MGC803 细胞在常规条件下传代培养,当细胞贴壁融合度达约 85%时接种于 6 孔板,并分组:对照组、CL(0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$)组、miR-224-5p 抑制组(miR-224-5p-i 组)、CL 联合 miR-224-5p 过表达组(CL+mimic 组)、CL 联合 si-EGR2 组(CL+si-EGR2 组)及 miR-224-5p 抑制联合 si-EGR2 组(miR-224-5p-i+si-EGR2 组),每组设 6 个复孔。CL 组采用终浓度为 0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 CL 处理 MGC803 细胞 24 h;miR-224-5p-i 组、CL+mimic 组均使用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂进行质粒转染,其中 CL+mimic 组在转染成功后再加用 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 CL 处理 24 h;对照组不作任何处理。

1.3.2 CCK-8 实验 将处于对数生长期的胃癌 MGC803 细胞消化并制备成单细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔约 5×10^3 个细胞。待细胞贴壁后,进行分组,均设 6 个复孔。处理 24、48、72 h 后,每孔加入

10 μL CCK-8 工作液,继续孵育 2 h,于 450 nm 波长下测定光密度(optical density, OD)值,并绘制细胞增殖曲线。实验均独立重复 3 次,结果取平均值用于统计学分析。

1.3.3 细胞凋亡实验 各组 MGC803 细胞按 4×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,采用 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒,按照试剂盒说明书进行操作。染色完成后使用流式细胞仪检测细胞早期及晚期凋亡比例,并通过配套软件进行数据分析。

1.3.4 Transwell 小室侵袭实验 采用 Transwell 小室(8 μm 孔径),上室预先铺设 Matrigel 基质胶,室温下凝胶固化。处理后的各组细胞以无血清培养基重悬,并以 200 μL /孔接种于上室;下室加入 600 μL 含 10%胎牛血清的完全培养基作为趋化液。培养 48 h 后,用棉签轻轻拭去上室未迁移细胞,4%甲醇固定 20 min,0.1%结晶紫染色 15 min,PBS 冲洗。于倒置显微镜下随机选取 5 个视野,计数侵袭细胞并取平均值用于统计分析。

1.3.5 细胞划痕愈合实验 将各组 MGC803 细胞以 5×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板中培养,待细胞单层铺满融合至约 90%后,使用无菌 200 μL 移液枪枪头在培养板表面沿直线划痕,形成人工创口。用 PBS 轻轻漂洗两遍以去除浮游细胞,随后加入无血清培养基继续培养。分别在划痕 0、24 h 时拍照记录细胞迁移情况。使用 ImageJ 软件测量划痕愈合区域面积,计算迁移愈合率,作为迁移能力评价指标。每组实验重复 3 次,取平均值进行统计分析。

1.3.6 RT-qPCR 检测 收集各组处理后的 MGC803 细胞,采用 Trizol 试剂提取总 RNA,使用反转录试剂盒逆转录合成 cDNA。取 2 μL RNA 进行反转录反应,随后进行 RT-qPCR,检测 miR-224-5p 的相对表达水平。miR-224-5p 引物序列:正向 AGCCC-CATCATCTACAGUG,反向 TCACAGTCACTAGGGC-ACC;U6 作为内参对照,其引物序列:正向 CTCG-CTTCGGCAGCACATATACT,反向 ACGCTTCACGAA-TTTGCGTGTC。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组 miR-224-5p 的相对表达量。

1.3.7 Western blot 检测 MGC803 细胞接种于 6 孔板中培养 48 h 后,收集细胞,PBS 洗涤,加入细胞

裂解液裂解细胞,提取总蛋白。检测蛋白浓度后,取 20 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳并转膜,封闭后,加入 Cyclin D1(1:1 000)、cleaved Caspase-3(1:1 000)、MMP-9(1:1 000)、EGR2(1:1 000)一抗稀释液,室温孵育 2 h。PBS 洗涤,再加入二抗室温孵育 1 h,化学发光法显色,以 GAPDH(1:2 000)为内参,分析蛋白相对表达。

1.3.8 双荧光素酶报告基因实验 由武汉金开瑞生物工程有限公司构建野生型 EGR2-WT 和突变型 EGR2-MUT 荧光素酶标记的质粒,MGC803 细胞生长至对数期时接种于 6 孔板中,将 EGR2-WT、EGR2-MUT 分别与 miR-224-5p mimics、miR-NC 共转染 MGC803 细胞 48 h,裂解细胞,12 000 r/min 离心 10 min(离心半径为 8.0 cm),收集上清液,检测各组细胞荧光素酶活性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,所有数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”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(One-way ANOVA)。当差异具有统计学意义时,进一步进行事后检

验,采用 Tukey 法或 Bonferroni 法进行多重比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CL 抑制 MGC803 细胞增殖并诱导凋亡

与对照组比较,CL 0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞活力均降低($P < 0.01$)。为避免细胞活力过低影响实验准确性,选择中间浓度(1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$)的 CL 进行后续实验。与对照组比较,CL 1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组凋亡率升高($P < 0.01$);与 CL 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,CL 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组凋亡率升高($P < 0.01$)。与对照组比较,CL 1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 Cyclin D 蛋白表达水平降低、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 CL 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,CL 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 Cyclin D 蛋白表达水平降低、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平升高($P < 0.01$)。详见图 1。

2.2 CL 抑制 MGC803 细胞迁移与侵袭能力

与对照组比较,CL 1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组迁移及侵袭细胞数、细胞划痕愈合率、MMP-9 蛋白表达水平减少($P < 0.01$);与 CL 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,CL 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组迁移及侵袭细胞数、细胞划痕愈合率、MMP-9 蛋白表达水平减少($P < 0.01$)。详见图 2。

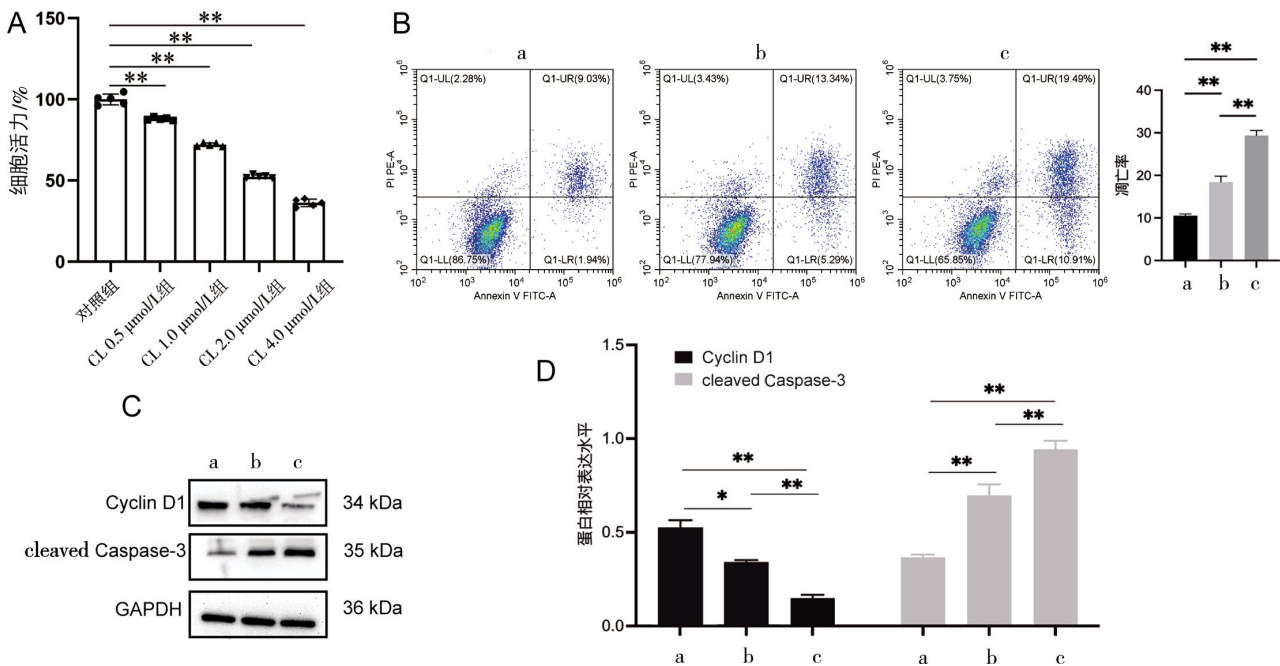


图 1 不同浓度 CL 对 MGC803 细胞增殖、凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig.1 Effects of different concentrations of CL on proliferation and apoptosis of MGC803 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

注:A 为 CCK-8 法检测不同浓度 CL 作用下 MGC803 细胞的活性变化;B 为流式细胞术检测细胞凋亡率变化;C、D 为 Western blot 检测 Cyclin D1 和 cleaved Caspase-3 蛋白的表达水平。a.对照组;b. CL 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组;c. CL 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

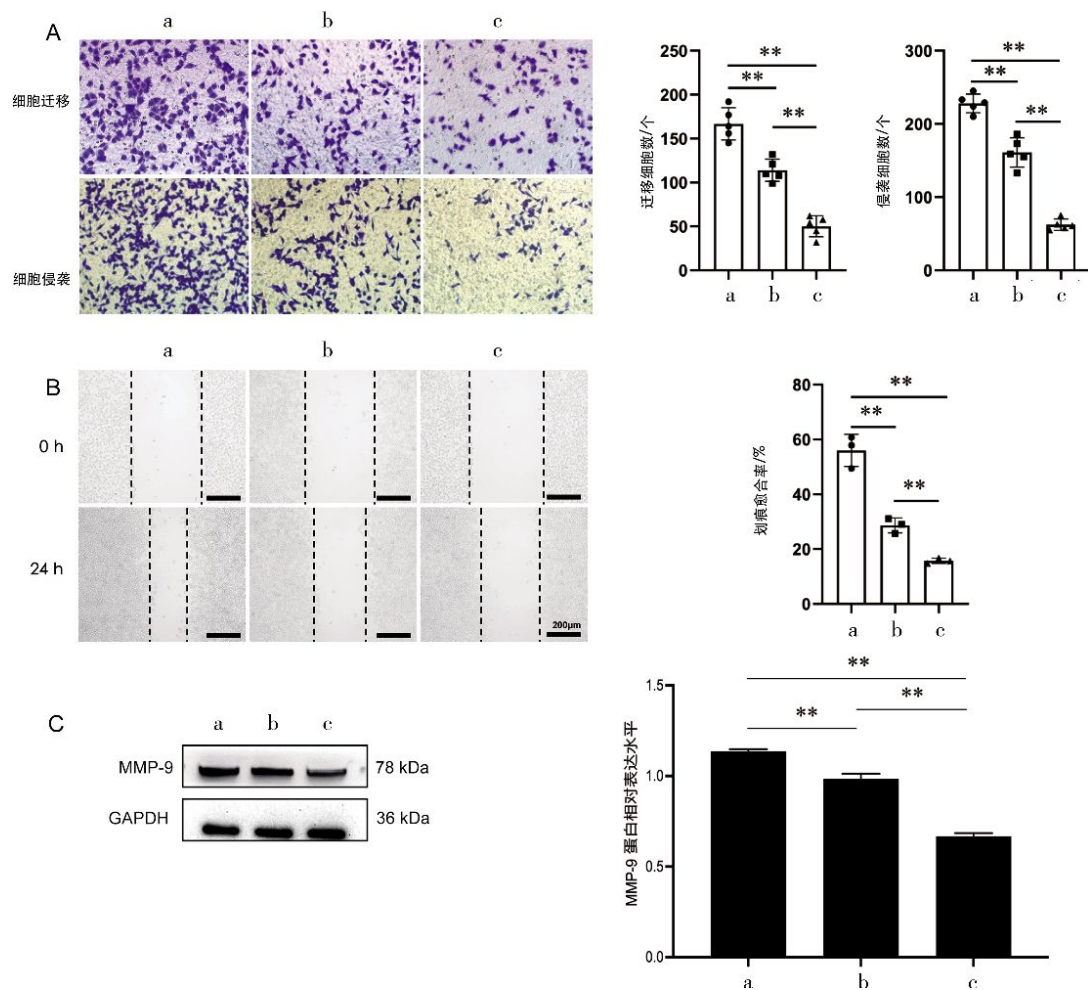


图2 不同浓度CL对MGC803细胞迁移与侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.2 Effects of different concentrations of CL on migratory and invasive capacities of MGC803 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:A为Transwell实验检测MGC803细胞迁移与侵袭能力;B为划痕实验检测细胞迁移速度与愈合面积;C为Western blot检测MMP-9蛋白表达水平。a.对照组;b. CL 1.0 μmol/L组;c. CL 2.0 μmol/L组。** $P<0.01$ 。

2.3 CL调控MGC803细胞中miR-224-5p与EGR2及其下游蛋白表达

与对照组比较,CL 2.0 μmol/L组miR-224-5p表达水平下降($P<0.01$),EGR2、cleaved Caspase-3蛋白表达水平升高($P<0.05, P<0.01$),Cyclin D1、MMP-9蛋白表达水平降低($P<0.01$)。详见图3。

2.4 miR-224-5p靶向调控EGR2

与WT+NC组比较,WT+mimic组荧光素酶活性降低($P<0.01$),MUT+NC与MUT+mimic组荧光素酶活性差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图4。

2.5 miR-224-5p mimic逆转CL的抑癌作用

与对照组比较,CL 2.0 μmol/L组细胞活力、划痕愈合率及Cyclin D1、MMP-9蛋白表达水平降低($P<0.01$),凋亡率及EGR2、cleaved Caspase-3蛋白表达水平升高($P<0.05, P<0.01$)。与CL 2.0 μmol/L

组比较,CL+mimic组细胞活力、划痕愈合率及Cyclin D1、MMP-9蛋白表达水平升高($P<0.05, P<0.01$),凋亡率及EGR2、cleaved Caspase-3蛋白表达水平降低($P<0.05, P<0.01$)。详见图5。

2.6 miR-224-5p mimic逆转CL的抑癌作用

与对照组比较,CL 2.0 μmol/L组和miR-224-5p-i组细胞活力降低($P<0.01$),凋亡率升高($P<0.01$),Cyclin D1、MMP-9蛋白及mRNA表达水平降低($P<0.01$),EGR2、cleaved Caspase-3蛋白及mRNA表达水平升高($P<0.01$),划痕愈合率降低($P<0.01$)。与miR-224-5p-i组比较,miR-224-5p-i+si-EGR2组细胞活力升高($P<0.001$),凋亡率降低($P<0.01$),Cyclin D1、MMP-9蛋白及mRNA表达水平升高($P<0.01$),EGR2、cleaved Caspase-3蛋白及mRNA表达水平降低($P<0.05, P<0.01$),划痕愈合率升高($P<0.01$)。详见图6。

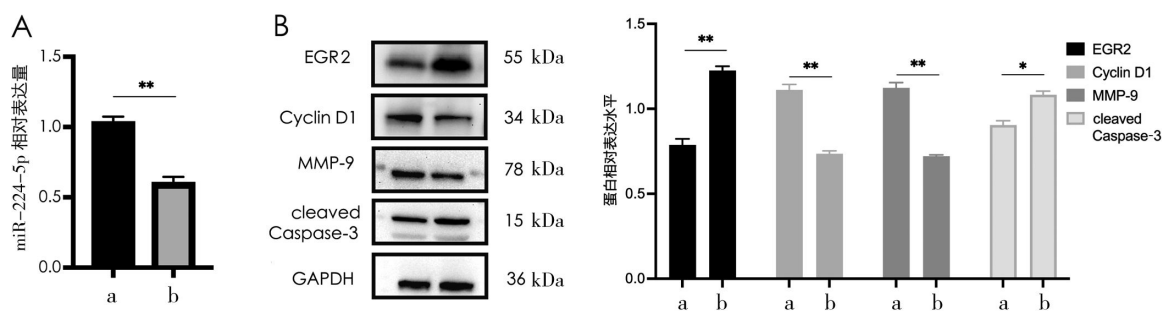


图3 CL对MGC803细胞中miR-224-5p表达及EGR2通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.3 Effects of CL on the expression levels of miR-224-5p and related proteins in the EGR2 pathway in MGC803 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:A为RT-qPCR检测2.0 $\mu\text{mol/L}$ CL处理后MGC803细胞中miR-224-5p的表达水平;B为Western blot检测EGR2、Cyclin D1、MMP-9、cleaved Caspase-3蛋白表达水平。a.对照组;b. CL 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组。 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

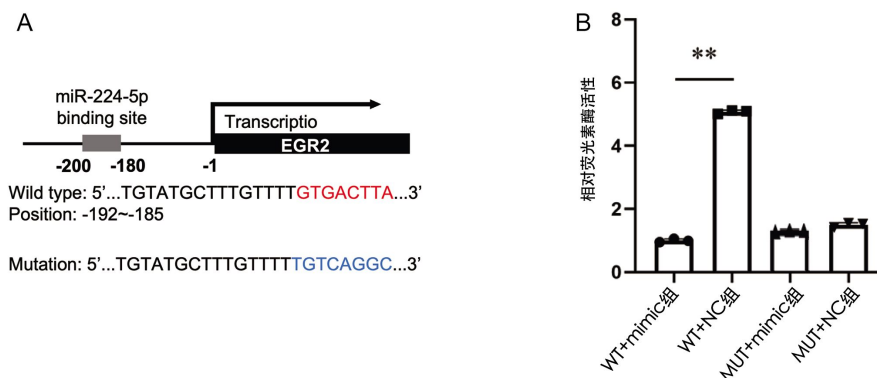


图4 miR-224-5p靶向调控EGR2的双荧光素酶报告实验结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.4 Results of the dual-luciferase reporter assay for the targeted regulatory effects of miR-224-5p on EGR2 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:A为miR-224-5p与EGR2的结合位点示意图及双荧光素酶实验检测流程;B为miR-224-5p mimic或miR-NC分别与EGR2 3' UTR野生型(WT)或突变型(MUT)共转染MGC803细胞后的荧光素酶活性变化。 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

3 讨论

雷公藤具有活血消肿、祛风除湿和清热解毒等传统药理作用,其活性成分CL在现代研究中被证实具有广泛的抗肿瘤活性。CL可通过调控有氧糖酵解、抑制血管生成以及干预细胞周期等多种机制发挥抗癌作用^[3-4],其在胃癌、肝癌及乳腺癌等多种恶性肿瘤中表现出良好的抗肿瘤效应^[7-9]。CL可通过调节细胞增殖与凋亡相关基因表达,显著抑制胃癌细胞增殖^[10]。Cyclin D1是细胞进入G₁/S期的关键调控因子,其表达水平的下调可阻断细胞周期进程并抑制肿瘤细胞增殖^[11]。Caspase-3作为细胞凋亡的核心执行酶,其裂解活化形式cleaved Caspase-3的表达水平与凋亡程度密切相关,抑制该蛋白表达可促进胃癌的发生和发展^[12]。此外,MMP-9是癌细胞侵袭能力

的重要调控分子,其表达水平升高通常提示更强的侵袭与转移潜能^[13]。

本研究初步探讨了不同浓度CL对MGC803细胞的生物学影响,发现其可明显抑制细胞增殖与侵袭,并诱导细胞凋亡,且呈现出一定的浓度依赖性,与已有研究结果一致^[7,10]。为进一步明确其作用机制,在后续实验中统一采用2.0 $\mu\text{mol/L}$ CL浓度进行处理,该浓度表现出最佳的抑癌效果,既能有效下调miR-224-5p表达,又能引起其下游通路的显著变化,具有代表性与实验可重复性,有助于聚焦机制研究并降低实验干扰。miRNA是一类非编码小RNA,广泛参与细胞增殖、分化、凋亡等过程,并在多种肿瘤发生发展中发挥关键调控作用,被认为是潜在的肿瘤分子标志物^[14-15]。miR-224-5p作为其中的重要成员,其在神经胶质瘤、黑色素瘤、结直肠癌等

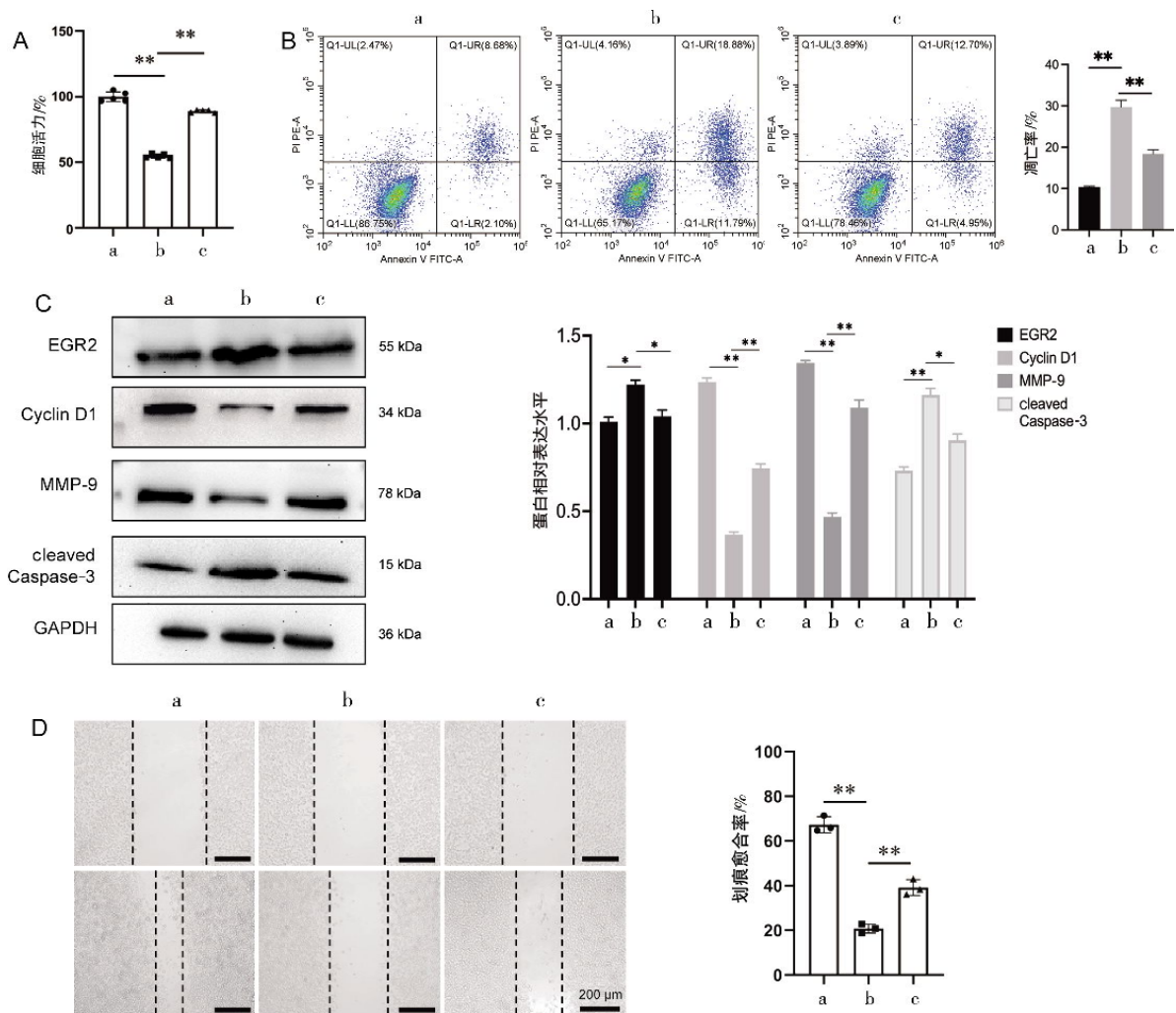


图5 miR-224-5p过表达对CL抑制MGC803细胞恶性行为的逆转作用($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig.5 Reversal effects of miR-224-5p overexpression on the inhibition of malignant behaviors of MGC803 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

注:A为CCK-8法检测细胞活性;B为流式细胞术检测细胞凋亡率;C为Western blot检测EGR2、Cyclin D1、MMP-9、cleaved Caspase-3蛋白表达水平;D为划痕愈合实验检测细胞迁移能力。a. 对照组;b. CL 2.0 μmol/L组;c. CL+miR-224-5p组。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

多种肿瘤中呈高表达状态^[16-18],在胃癌中亦表现出上调趋势,且其表达抑制可有效抑制胃癌细胞增殖、迁移与侵袭^[19]。本研究结果发现,下调miR-224-5p可显著抑制MGC803细胞的增殖与迁移,并诱导其凋亡,提示miR-224-5p可能在胃癌中发挥促癌作用。通过构建miR-224-5p过表达模型并联合CL处理,发现过表达miR-224-5p可明显逆转CL的抑癌作用,进一步证实CL可能通过下调miR-224-5p实现其抗肿瘤效应。为明确miR-224-5p的靶点,本研究结合双荧光素酶实验验证,确认EGR2为其直接靶基因。EGR2是一种转录因子,在多种肿瘤中与细胞增殖和凋亡密切相关^[20-21]。前期研究表明,EGR2在胃癌组织中呈低表达,其过表达可抑制胃癌细胞的增殖和迁移^[22]。此外,有报道指出,miR-224-5p可

通过靶向EGR2促进甲状腺乳头状癌细胞的迁移及(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进程^[23]。本研究发现,CL处理可抑制miR-224-5p表达并上调EGR2表达,提示CL可能通过调控miR-224-5p/EGR2信号轴发挥抑癌作用。在功能实验中,进一步验证了EGR2在CL/miR-224-5p通路中的关键作用。siRNA敲低EGR2后,可部分逆转CL或miR-224-5p抑制剂对MGC803细胞增殖、凋亡与迁移的调控效应。在Western blot检测结果中,与CL 2.0 μmol/L组比较,CL+si-EGR2组EGR2蛋白水平下降并不显著,但mRNA水平出现明显下调,说明EGR2在转录水平已被有效抑制。这种mRNA与蛋白表达不一致的现象可能源于多方面原因:蛋白水平常受到转录和翻译后调控机制的影响,mRNA表达的下降

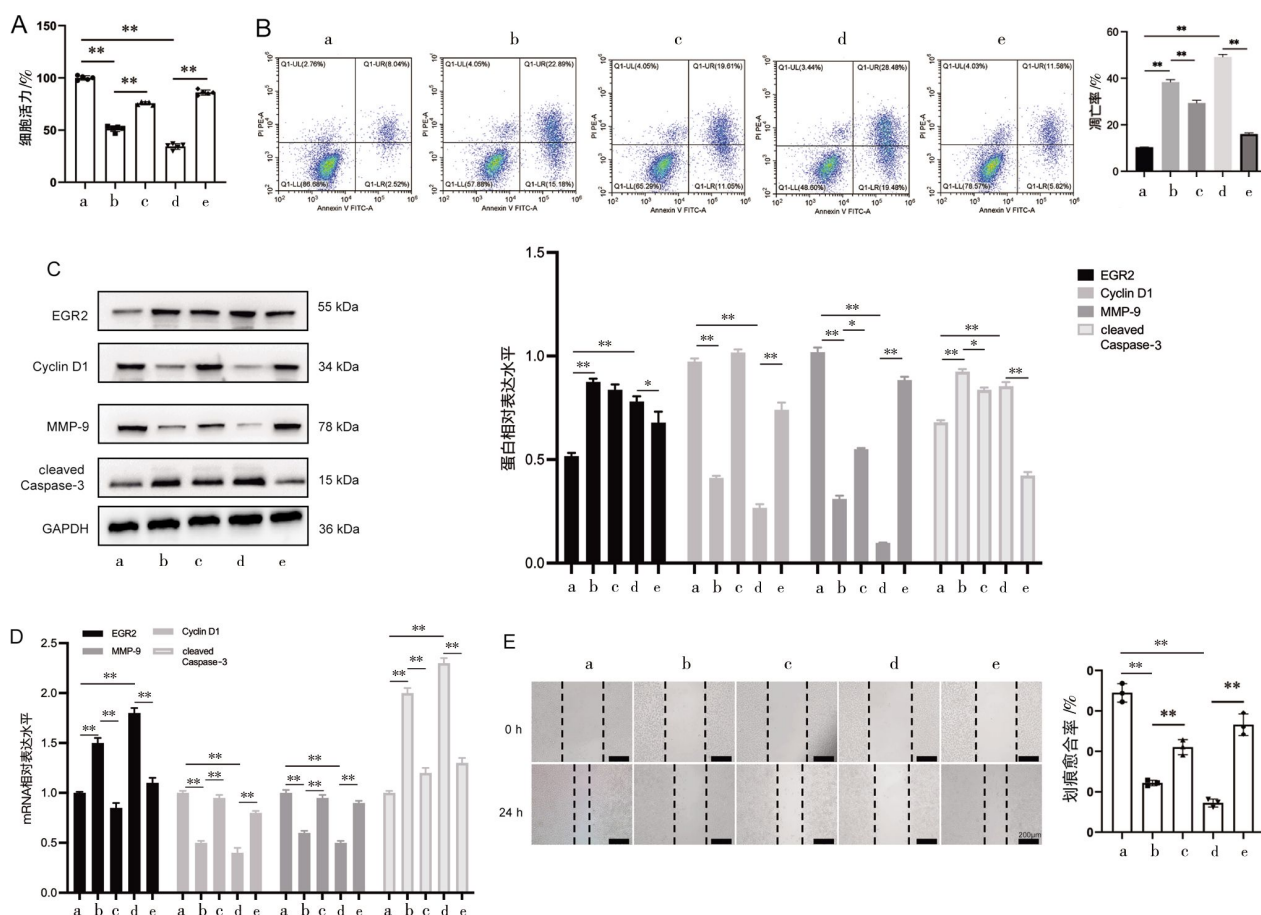


图6 敲低 EGR2 对 CL 或 miR-224-5p 抑制剂抗肿瘤效应的逆转作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.6 Reversal effects of EGR2 knockdown on the anti-tumor activity of CL or miR-224-5p inhibitor ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:A 为 CCK-8 法检测细胞活性;B 为流式细胞术检测细胞凋亡率;C 为 Western blot 检测 EGR2、Cyclin D1、MMP-9、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平;D 为 RT-qPCR 检测 EGR2、Cyclin D1、MMP-9、cleaved Caspase-3 mRNA 表达;E 为划痕愈合实验检测细胞迁移能力。a.对照组;b. CL 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组;c. CL+si-EGR2 组;d. miR-224-5p-i 组;e. miR-224-5p-i+si-EGR2 组。 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

未必立即反映到蛋白水平;EGR2 蛋白可能具有相对较长的半衰期,导致其降解速度慢于转录抑制,从而出现表达滞后的情况;蛋白检测结果亦可能受到抗体敏感性与特异性的影响,出现轻微差异。为进一步验证该结果,可在后续实验中增加时间梯度(如 24、48、72 h)的动态检测,以明确 EGR2 蛋白是否存在滞后性变化,从而更准确地揭示其在 CL/miR-224-5p 通路中的调控作用。但结合其 mRNA 变化趋势及下游蛋白(cleaved Caspase-3、Cyclin D1、MMP-9)与细胞功能变化的结果,仍可证实 si-EGR2 干预在功能上确实发挥了部分逆转作用,进一步支持 EGR2 作为 miR-224-5p 靶基因及 CL 调控通路中的关键分子。

综上所述,CL 可通过下调 miR-224-5p 表达并解除其对 EGR2 的负调控,从而抑制胃癌 MGC803 细胞的增殖与侵袭,诱导凋亡。该研究揭示了 CL 作

用的分子机制,为其作为天然抗癌药物的深入开发提供了理论依据。但本研究仍存在一定局限性,后续尚需在其他胃癌细胞系及体内模型中进一步验证其普适性与稳定性。

参考文献

- [1] SUNDAR R, NAKAYAMA I, MARKAR S R, et al. Gastric cancer[J]. The Lancet, 2025, 405(10494): 2087-2102.
- [2] DUAN Y T, XU Y H, DOU Y, et al. Helicobacter pylori and gastric cancer: Mechanisms and new perspectives[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2025, 18(1): 10.
- [3] YANG C, XUE R, QIN C L, et al. Celastrol induces ferroptosis by regulating CERKL to exert anti-gastric cancer effect[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2025, 53(3): 931-949.
- [4] WU J, YE F, XU T. Celastrol impairs tumor growth by modulating the CIP2A-GSK3 β -MCL-1 axis in gastric cancer cells[J]. Aging, 2023, 15(14): 6894-6904.
- [5] LIN H, WANG J G, WANG T, et al. The LncRNA MIR503HG/

- miR-224-5p/TUSC3 signaling cascade suppresses gastric cancer development via modulating ATF6 branch of unfolded protein response[J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: 708501.
- [6] YANG L Q, LI L N, CHANG P, et al. miR-25 regulates gastric cancer cell growth and apoptosis by targeting EGR2 [J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 690196.
- [7] ZHAN D M, NI T Y, WANG H B, et al. Celastrol inhibits the proliferation and decreases drug resistance of cisplatin-resistant gastric cancer SGC7901/DDP cells[J]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2022, 22(2): 270-279.
- [8] ZENG D Q, ZHANG L P, LUO Q. Celastrol-regulated gut microbiota and bile acid metabolism alleviate hepatocellular carcinoma proliferation by regulating the interaction between FXR and RXR α in vivo and in vitro[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14: 1124240.
- [9] QI B J, YAN Q G, ZHANG P, et al. Celastrol enhances tamoxifen sensitivity in the treatment of triple negative breast cancer via mitochondria mediated apoptosis pathway[J]. *American Journal of Translational Research*, 2023, 15(4): 2703-2715.
- [10] 李 佳, 杨晓丹, 刘永叶. 雷公藤红素对胃癌细胞体外生长活力及增殖、凋亡基因表达的调节作用[J]. *中国实用医药*, 2021, 16(8): 24-27.
- [11] 伍梦思, 刘 华, 李杏瑶, 等. 基于 EGFR/MAPK/ERK 信号通路探讨鳖甲煎丸对 MHCC-97H 肝癌细胞皮下瘤的抑瘤作用[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(2): 227-234.
- [12] 熊 见, 魏宇燕, 李 亮, 等. Bel-2、Caspase-3、Apo2.7 在胃癌变过程中的表达及与细胞凋亡的相关性研究[J]. *检验医学与临床*, 2021, 18(15): 2155-2158.
- [13] RASHID Z A, BARDAWEEL S K. Novel matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) inhibitors in cancer treatment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(15): 12133.
- [14] 杨超然, 李思柔, 刘 源, 等. 非编码 RNA 对肝细胞癌肿瘤微环境中免疫细胞的作用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(4): 961-967.
- [15] 张 尧, 张 锴, 康鹏东, 等. 微小 RNA-200c 在胰腺癌中的研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(4): 961-964.
- [16] LIU L T, XU Q, XIONG Y, et al. LncRNA LINC01094 contributes to glioma progression by modulating miR-224-5p/CHSY1 axis[J]. *Human Cell*, 2022, 35(1): 214-225.
- [17] LIU Y F, RUAN H R, LU F, et al. miR-224-5p acts as a tumour suppressor and reverses the resistance to BRAF inhibitor in melanoma through directly targeting PAK4 to block the MAPK pathway[J]. *Pathology-Research and Practice*, 2023, 249: 154772.
- [18] YANG L M, ZHENG Q, LIU X J, et al. Exosome-transmitted miR-224-5p promotes colorectal cancer cell proliferation via targeting ULK2 in p53-dependent manner[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2024, 37(1): 71-84.
- [19] FANG X H, DONG Y, YANG R L, et al. LINC00619 restricts gastric cancer progression by preventing microRNA-224-5p-mediated inhibition of OPCML[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2020, 689: 108390.
- [20] WANG J, ZHANG Y M, LIU L, et al. NFAT2 overexpression suppresses the malignancy of hepatocellular carcinoma through inducing Egr2 expression[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 966-1006.
- [21] YU X Z, ZHANG Y, LUO F M, et al. The role of microRNAs in the gastric cancer tumor microenvironment[J]. *Molecular Cancer*, 2024, 23(1): 170.
- [22] 赵蓉蓉, 付兆媛. MicroRNA-330 靶向 EGR-2 基因抑制胃癌细胞生长和迁移[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(6): 1055-1062.
- [23] ZANG C S, HUANG H T, QIU J, et al. miR-224-5p targets EGR2 to promote the development of papillary thyroid carcinoma[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2020, 24(9): 4890-4900.

(本文编辑 周 旦)