



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2024.02.09

文章编号: 2095-1264(2024)02-0193-10

木香炔内酯通过调控 circ_0000285/miR-409-3p 影响胃癌细胞恶性表型*

刘 昭¹, 郑志超², 张亚鹏¹, 任玉川^{1*}

(¹阳泉市第一人民医院 肿瘤内科, 山西 阳泉, 045001; ²辽宁省肿瘤医院 胃外科, 辽宁 沈阳, 110042)

摘要: **目的** 探讨木香炔内酯对胃癌细胞恶性表型的影响及可能机制。**方法** 体外培养胃癌细胞 HGC-27, 采用不同剂量 (2.5、10、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 木香炔内酯干预 HGC-27 细胞 24 h, 或转染 circ_0000285 小干扰 RNA 至 HGC-27 细胞后培养 24 h。采用 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 木香炔内酯干预转染 circ_0000285 过表达载体的 HGC-27 细胞 24 h。CCK-8 法和克隆形成实验检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 划痕实验和 Transwell 检测细胞迁移和侵袭, Western blotting 检测细胞中 Bcl-2、Bax、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达, RT-qPCR 检测 circ_0000285 和 miR-409-3p 表达, 双荧光素酶报告基因实验验证 circ_0000285 和 miR-409-3p 的调控关系。**结果** 木香炔内酯可降低 HGC-27 细胞的 OD 值、集落形成数、迁移距离、侵袭数, 以及 Bcl-2、N-cadherin 蛋白表达水平, 提高细胞凋亡率及 Bax、E-cadherin 蛋白表达水平, 并呈剂量依赖性。木香炔内酯可抑制 HGC-27 细胞中 circ_0000285 的表达, 促进 miR-409-3p 表达。干扰 circ_0000285 表达可降低 HGC-27 细胞的增殖、迁移能力, 并促进细胞凋亡。circ_0000285 可靶向结合并负调控 miR-409-3p。过表达 circ_0000285 可逆转木香炔内酯对 HGC-27 细胞恶性表型的影响。**结论** 木香炔内酯可能通过调控 circ_0000285/miR-409-3p 轴抑制胃癌细胞的恶性生物学行为。

关键词: 木香炔内酯; 胃癌; circ_0000285; miR-409-3p; 细胞增殖; 迁移; 侵袭; 凋亡

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A

Costunolide affects the malignant phenotype of gastric cancer cells by regulating circ_0000285/miR-409-3p*

LIU Zhao¹, ZHENG Zhichao², ZHANG Yapeng¹, REN Yuchuan^{1*}

(¹Department of Oncology, First People's Hospital of Yangquan City, Yangquan, 045001, Shanxi, China;

²Department of Gastric Surgery, Liaoning Cancer Hospital, Shenyang, 110042, Liaoning, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of costunolide on the malignant phenotype of gastric cancer cells and its possible mechanism. **Methods** Gastric cancer cells HGC-27 were cultured *in vitro*, and treated with costunolide at different doses (2.5, 10, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h, or transfected with circ_0000285 small interfering RNA and then cultured for 24 h. The 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ costunolide was used to intervene the HGC-27 cells transfected with circ_0000285 overexpression vector for 24 h. CCK-8 method and clone formation test were used to detect the cell proliferation. The flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Scratch test and Transwell were used to detect cell migration and invasion. Western blotting was used to detect the protein expressions of Bcl-2, Bax, E-cadherin and N-cadherin in the cells, and RT-qPCR was used to detect the expressions of circ_0000285 and miR-409-3p. The dual luciferase reporter gene experiment was used to verify the regulatory relationship between circ_0000285 and miR-409-3p. **Results** Costunolide could reduce the OD value of HGC-27 cells, the number of colonies formed, the migration distance, the number of invasion, and the protein expression levels of

*基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(20170540567)。

作者简介: 刘昭, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 肿瘤内科。

*通信作者: 任玉川, 男, 副主任医师, 研究方向: 肿瘤内科。

Bcl-2 and N-cadherin, while it could increase the cell apoptosis rate, and the protein expression levels of Bax and E-cadherin in a dose-dependent way. Costunolide could inhibit the expression of circ_0000285, but promote the expression of miR-409-3p in HGC-27 cells. Interference with circ_0000285 expression could decrease the proliferation and migration of HGC-27 cells, and promote cell apoptosis. circ_0000285 could target and negatively regulate miR-409-3p. Overexpression of circ_0000285 could reverse the inhibitory effect of costunolide on HGC-27 cell phenotypes. **Conclusion** Costunolide may inhibit the malignant biological behavior of gastric cancer cells by regulating the circ_0000285/miR-409-3p axis.

Keywords: Costunolide; Gastric cancer; Circ_0000285; MiR-409-3p; Cell proliferation; Migration; Invasion; Apoptosis

0 前言

胃癌在我国具有较高的发病率,由于目前临床对胃癌的发病机制暂未达成统一认识,因此缺乏有效治疗手段,进一步导致其对患者的身心健康产生严重威胁。我国传统中药及其活性成分在中医药理论中功效较多,且副作用小、作用靶点多,被广泛应用于中医临床,而越来越多的研究发现其在肿瘤的治疗中表现出一定的优势^[1]。木香炔内酯是中药木香的主要活性成分之一,属于倍半萜内酯类化合物,具有抗炎、抗真菌及抗肿瘤等功效^[2]。研究发现,木香炔内酯可通过上调 Bax 和 Cleaved Caspase-3 表达及下调 Bcl-2 表达抑制乳腺癌细胞增殖和迁移并诱导细胞凋亡^[3],还可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路降低胆管癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力^[4]。但目前,木香炔内酯对胃癌细胞的相关作用机制尚未有研究阐明。

环状 RNA (circRNA) 和微小 RNA (miRNA) 是不同类型的非编码 RNA,其中 circRNA 具有调控 miRNA 靶基因表达从而影响细胞生物学变化的重要作用^[5-6]。有报道称, circ_0000285 在骨肉瘤^[7]和宫颈癌^[8]中表达上调,发挥促肿瘤发展作用;此外, circ_0000285 在膀胱癌中表达下调,并与患者临床病理特征之间具有密切联系,也是膀胱癌诊断、治疗中的重要生物标志物^[9],但其在胃癌中的发展研究相对较少。预测软件显示 circ_0000285 可能靶向结合 miR-409-3p。研究显示, miR-409-3p 不同表达水平对胃癌细胞增殖可产生不同程度的影响,其表达上调在胃癌的发生发展中起抑癌作用^[10]。因此,本研究通过构建 circ_0000285/miR-409-3p 轴,探讨木香炔内酯对胃癌细胞恶性表型的影响及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

HGC-27 细胞系(中国科学院上海细胞库)。木香

炔内酯(纯度大于 98%,上海源叶生物)。Bcl-2、Bax、E-cadherin、N-cadherin 一抗抗体(美国 Santa Cruz);PCR 试剂盒(大连宝生物);RNA 抽提试剂盒、逆转录试剂盒、CCK-8、BCA 试剂盒、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(北京索莱宝);Lipofectamine™ 2000 试剂盒(美国 Invitrogen);circ_0000285 野生型质粒(wt-circ_0000285)、circ_0000285 突变型质粒(mut-circ_0000285)、circ_0000285 小干扰 RNA (si-circ_0000285)、乱序无意义阴性序列(si-NC)、circ_0000285 过表达载体(pcDNA-circ_0000285)、空载体(pcDNA)、PCR 引物(上海吉玛生物)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 复苏 HGC-27 细胞,将其放入 FBS 浓度为 10% 的培养基中。取对数生长期细胞,用培养基稀释调整细胞密度后,均匀地接种至 6 孔板。用无血清培养基将 siRNA 和过表达质粒稀释并混匀,加入培养孔,继续培养 24 h。

1.2.2 细胞分组 将对数生长期 HGC-27 细胞接种到 24 孔板,按照上述转染方法分别转染 si-NC、si-circ_0000285,记为 si-NC 组、si-circ_0000285 组。未转染的 HGC-27 细胞设为对照组。将木香炔内酯分别稀释为 2.5、10、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,加入细胞培养孔中,记为木香炔内酯低、中、高剂量组。另外,根据上述方法将 circ_0000285 过表达质粒和对照 pcDNA 转染到 HGC-27 细胞中,将细胞与 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 木香炔内酯共孵育,记为木香炔内酯+pcDNA 组、木香炔内酯+pcDNA-circ_0000285 组。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖 将 HGC-27 细胞经细胞转染和木香炔内酯处理后接种于 96 孔板,加入 100 μL 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h,然后每孔加入 CCK-8,孵育 1 h,在 450 nm 处用酶标仪测定吸光度。

1.2.4 克隆形成实验 将 HGC-27 细胞以 1.0×10^4 个/孔接种于 6 孔板,按照分组进行相应处理,然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 14 d。将细胞用多聚甲

醛固定 30 min, 0.1% 结晶紫染色。随后擦去过量的结晶紫, 用 PBS 缓冲液冲洗细胞, 观察细胞集落形成情况并拍照。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 取 HGC-27 细胞培养 48 h, 收集细胞用 PBS 冲洗, 再加入 500 μ L 结合缓冲液进行重悬, 根据 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒操作说明书先后加入 10 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI, 室温避光染色 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 计算凋亡率。

1.2.6 划痕实验检测细胞迁移 将 HGC-27 细胞以 2.5×10^4 个/孔接种于 6 孔板, 按照分组进行相应处理。使用无菌移液管尖端在细胞培养板上划线, 然后用新鲜培养基洗涤 2 次, 孵育。分别于 0 h、24 h 在显微镜下观察划痕间距, 记为 d_{0h} 和 d_{24h} 。细胞迁移距离 (μ m) = $d_{0h} - d_{24h}$ 。

1.2.7 Transwell 检测细胞侵袭 侵袭实验: 收集 HGC-27 细胞, 转染后, 将细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种在聚碳酸酯膜上, 并将涂层插入上室。然后用 4% 多聚甲醛固定细胞, 0.1% 结晶紫染色 15 min, 在显微镜下计数 5 个不同视野的浸润细胞数。迁移实验: 收集各组 HGC-27 细胞接种于上室 (1×10^5 个/孔), 上室不铺 Matrigel 基质胶, 其余操作同侵袭实验。

1.2.8 Western blotting 检测蛋白表达 取适量 RIPA 裂解液缓慢加入 HGC-27 细胞, 采用 BCA 法提取总蛋白, SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 转印至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭, 加入一抗孵育、二抗过夜。采用 Quantity One 法进行蛋白定量。

1.2.9 RT-qPCR 检测 circ_0000285 和 miR-409-3p 表达 将 HGC-27 细胞以 2.5×10^4 个/孔接种于 6 孔板, 按照分组进行相应处理, 处理时间为 24 h, 然后分别加入 1 mL TRIzol 试剂提取总 DNA, 紫外分光光度计检测。建立反转录体系, 采用 20 μ L RNase-Free ddH₂O 作为补足体系。以 cDNA 为模板进行扩增, 95 $^{\circ}$ C 3 min、95 $^{\circ}$ C 10 s、58 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环。引物序列: circ_0000285 上游 5'-TACC TCTGCAGGCAGGAACT-3', 下游 5'-TCACATGAATTAGGTGGGACTT-3'; miR-409-3p 上游 5'-GGTACGACTACGACATACGGC-3', 下游 5'-CGCTCAGACACGCGTCGT-3'; GAPDH 上游 5'-CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC-3', 下游 5'-AAATGAGCCCCAGCCTTCTC-3'; U6 上游 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',

下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。以 GAPDH 为内参检测 circ_0000285 的相对表达量, 以 U6 为内参检测 miR-409-3p 的相对表达量。

1.2.10 双荧光素酶报告基因实验 将 HGC-27 细胞以 2.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 经显微镜观察细胞汇合度 > 30% 时, 采用 Lipofectamine™ 2000 脂质体法对细胞进行转染, 将转染的细胞分为 wt-circ_0000285+miR-409-3p mimics 组、wt-circ_0000285+miR-NC 组、mut-circ_0000285+miR-409-3p mimics 组、mut-circ_0000285+miR-NC 组。6 h 后更换培养基, 继续培养 48 h, 对细胞中的荧光素酶活性进行分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件分析实验数据。计量资料以“均数 \pm 标准差” ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较行独立样本 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 木香烃内酯对胃癌细胞增殖和凋亡的影响

与对照组比较, 木香烃内酯组胃癌细胞 OD 值和集落形成数及 Bcl-2 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$), 凋亡率和 Bax 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$) (图 1)。

2.2 木香烃内酯对胃癌细胞迁移和侵袭的影响

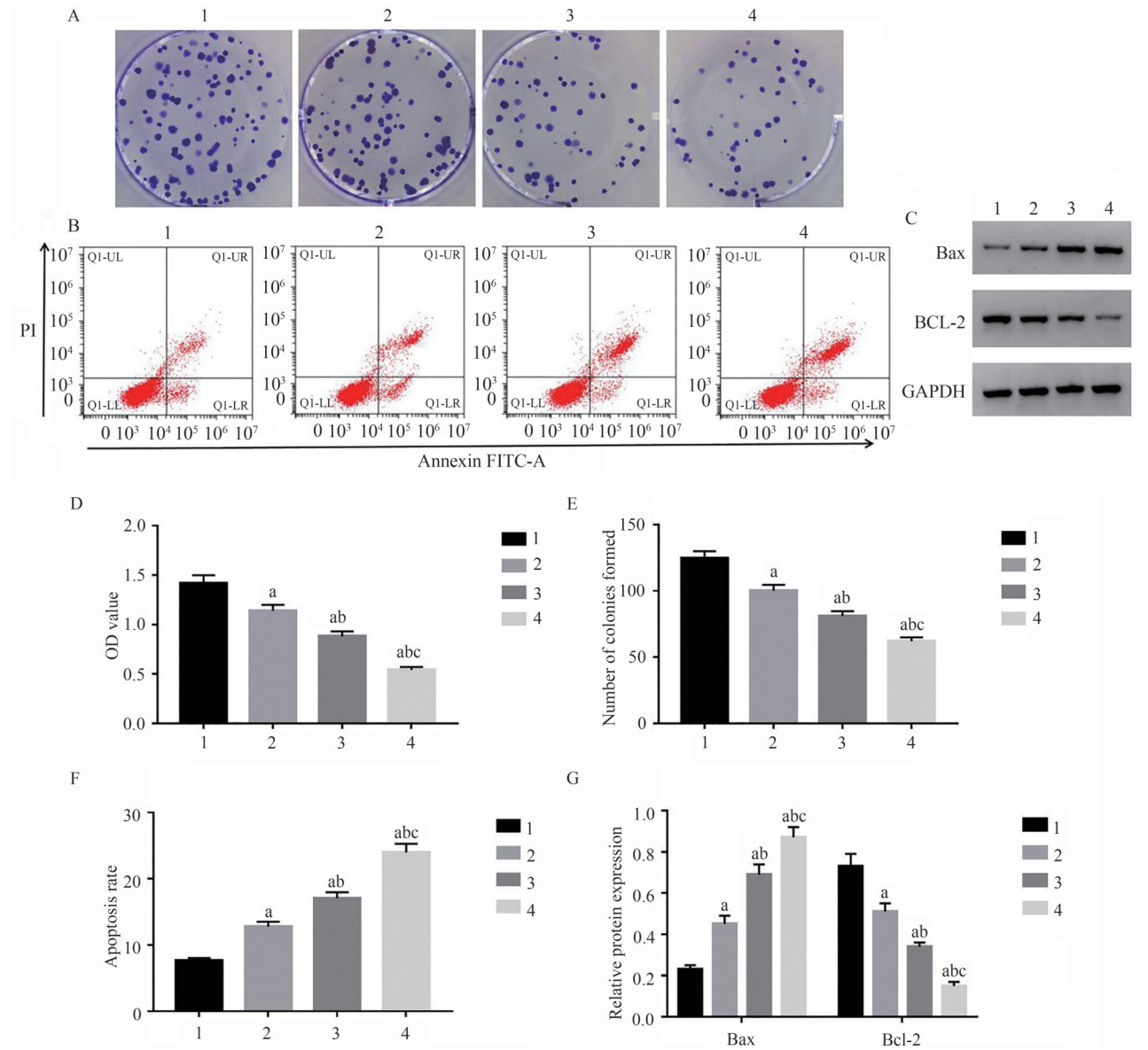
与对照组相比, 木香烃内酯组胃癌细胞迁移距离、侵袭数和 N-cadherin 蛋白表达显著减少 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 木香烃内酯对胃癌细胞中 circ_0000285 和 miR-409-3p 表达的影响

与对照组比较, 木香烃内酯组胃癌细胞 circ_0000285 表达降低 ($P < 0.05$), miR-409-3p 表达升高 ($P < 0.05$), circ_0000285 和 miR-409-3p 表达水平组间两两比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.4 circ_0000285 靶向结合 miR-409-3p

Circular RNA Interactome 靶基因预测软件显示, circ_0000285 与 miR-409-3p 存在结合位点。共转染 wt-circ_0000285 与 miR-409-3p mimics 的细胞荧光素酶活性显著低于共转染 wt-circ_0000285 与 miR-NC 的细胞 ($P < 0.05$) (图 4), 说明 circ_0000285 可靶向结合 miR-409-3p。



注:(1) 对照组;(2): 木香烃内酯低剂量组;(3) 木香烃内酯中剂量组;(4) 木香烃内酯高剂量组。(A、E)木香烃内酯对胃癌细胞集落形成的影响;(B、F)木香烃内酯对胃癌细胞凋亡的影响;(C、G)木香烃内酯对胃癌细胞中 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响;(D)木香烃内酯对胃癌细胞活性的影响。与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与木香烃内酯低剂量组相比, ^b $P < 0.05$; 与木香烃内酯中剂量组相比, ^c $P < 0.05$ 。

Note: (1) Control group; (2) Costunolide low-dose group; (3) Costunolide middle-dose group; (4) Costunolide high-dose group. (A, E) The effect of costunolide on the colony formation of gastric cancer cells; (B, F) The effect of costunolide on the apoptosis of gastric cancer cells; (C, G) The effect of costunolide on the expression of Bax and Bcl-2 proteins in gastric cancer cells; (D) The effect of costunolide on the activity of gastric cancer cells. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with the costunolide low-dose group, ^b $P < 0.05$; compared with the costunolide middle-dose group, ^c $P < 0.05$.

图1 木香烃内酯对胃癌细胞增殖和凋亡的影响

Fig. 1 The effects of costunolide on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells

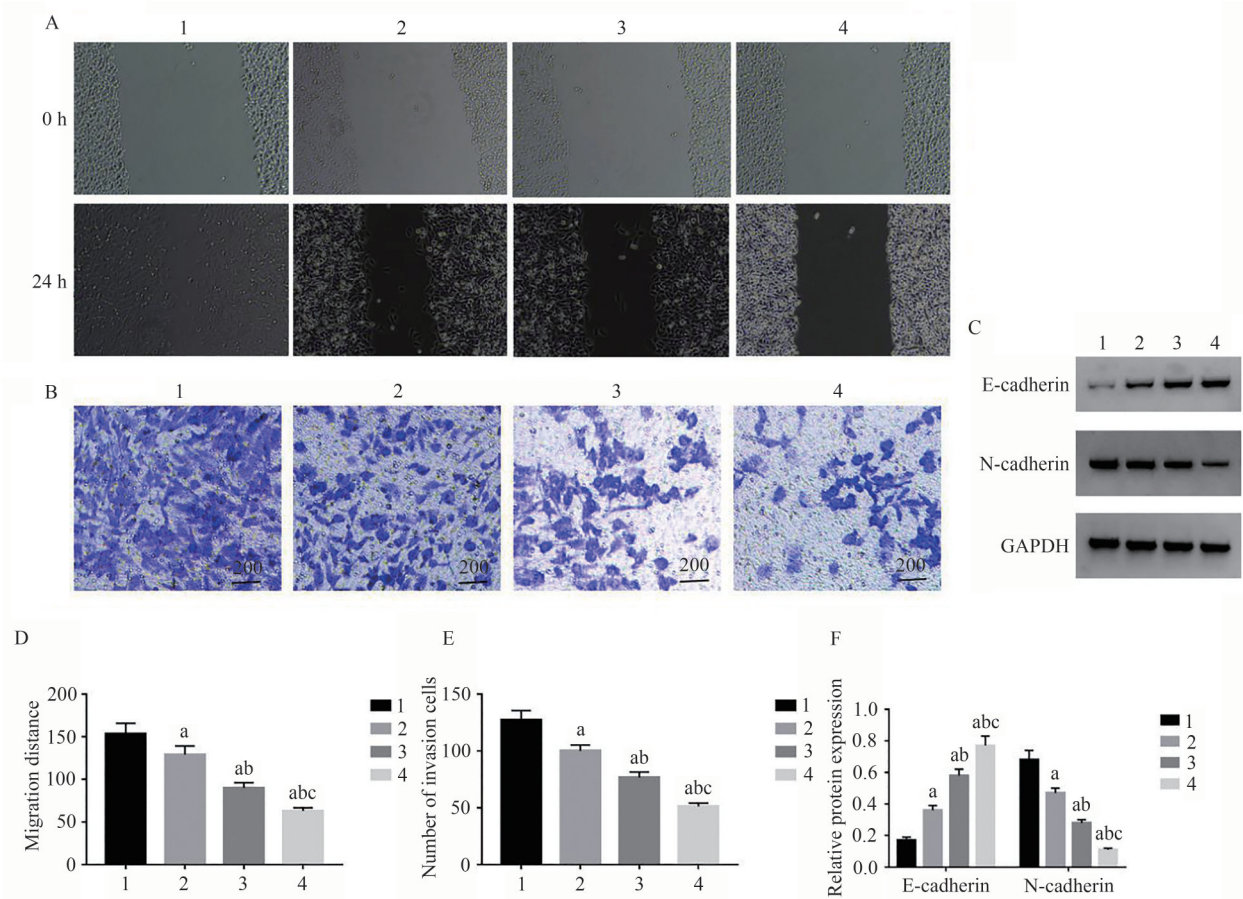
2.5 干扰 circ_0000285 对胃癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

转染 si-circ_0000285 可抑制胃癌细胞中 circ_0000285 的表达 ($P < 0.05$), 增加 miR-409-3p 表达, 抑制细胞增殖、侵袭和迁移, 增加细胞凋亡率, 促进

Bax、E-cadherin 蛋白表达, 减少 Bcl-2、N-cadherin 蛋白表达 ($P < 0.05$) (图 5)。

2.6 过表达 circ_0000285 逆转木香烃内酯对胃癌细胞增殖和凋亡的影响

与木香烃内酯+pcDNA 组比较, 木香烃内酯+pcD-

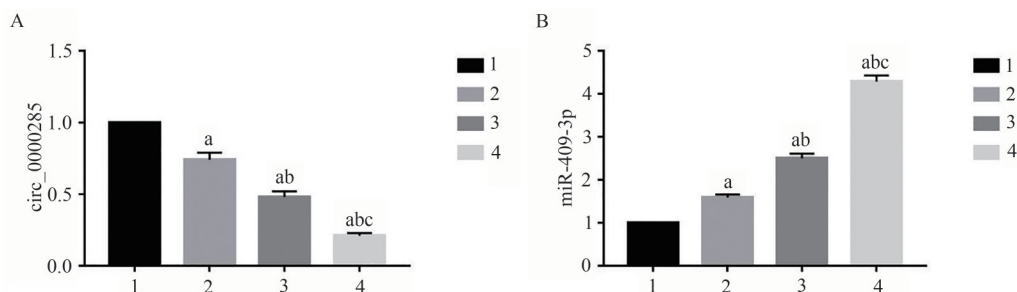


注:(1)对照组;(2):木香烃内酯低剂量组;(3)木香烃内酯中剂量组;(4)木香烃内酯高剂量组。(A、D)木香烃内酯对胃癌细胞迁移的影响;(B、E)木香烃内酯对胃癌细胞侵袭的影响;(C、F)木香烃内酯对胃癌细胞中E-cadherin、N-cadherin蛋白表达的影响。与对照组相比,^a $P < 0.05$;与木香烃内酯低剂量组相比,^b $P < 0.05$;与木香烃内酯中剂量组相比,^c $P < 0.05$ 。

Note: (1) Control group; (2) Costunolide low-dose group; (3) Costunolide middle-dose group; (4) Costunolide high-dose group. (A, D) The effect of costunolide on the migration of gastric cancer cells; (B, E) The effect of costunolide on the invasion of gastric cancer cells; (C, F) The effect of costunolide on the expression of E-cadherin and N-cadherin protein in gastric cancer cells. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with the costunolide low-dose group, ^b $P < 0.05$; compared with the costunolide middle-dose group, ^c $P < 0.05$.

图2 木香烃内酯对胃癌细胞迁移和侵袭的影响

Fig. 2 The effects of costunolide on the migration and invasion of gastric cancer cells

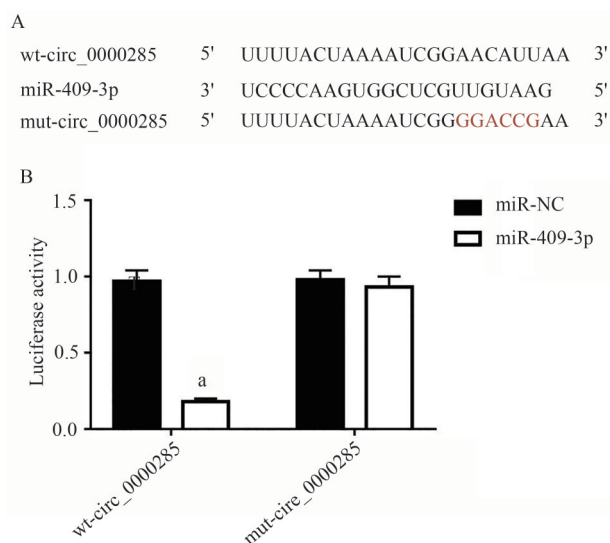


注:(A)木香烃内酯对胃癌细胞中 circ_0000285 表达的影响;(B)木香烃内酯对胃癌细胞中 miR-409-3p 表达的影响。与对照组相比,^a $P < 0.05$;与木香烃内酯低剂量组相比,^b $P < 0.05$;与木香烃内酯中剂量组相比,^c $P < 0.05$ 。

Note: (A) The effect of costunolide on expression of circ_0000285 in gastric cancer cells; (B) The effect of costunolide on the expression of miR-409-3p in gastric cancer cells. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with the costunolide low-dose group, ^b $P < 0.05$; compared with the costunolide middle-dose group, ^c $P < 0.05$.

图3 木香烃内酯对胃癌细胞中 circ_0000285 和 miR-409-3p 表达的影响

Fig. 3 The effects of costunolide on the expressions of circ_0000285 and miR-409-3p in gastric cancer cells



注:(A) circ_0000285 和 miR-409-3p 的互补序列;(B) 双荧光素酶活性检测。与 miR-NC 组相比,* $P<0.05$ 。

Note: (A) Complementary sequence of circ_0000285 and miR-409-3p; (B) Dual luciferase activity detection. Compared with miR-NC group, * $P<0.05$.

图4 circ_0000285 和 miR-409-3p 的互补序列及双荧光素酶报告实验

Fig. 4 Complementary sequence of circ_0000285 and miR-409-3p and dual luciferase reporter experiment

NA-circ_0000285 组胃癌细胞中 circ_0000285 表达升高,miR-409-3p 表达降低,细胞 OD 值、集落形成数升高,凋亡率降低,Bax 蛋白表达降低,Bcl-2 蛋白表达升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)(图6)。

2.7 过表达 circ_0000285 逆转木香烯内酯对胃癌细胞迁移和侵袭的影响

与木香烯内酯+pcDNA 组比较,木香烯内酯+pcDNA-circ_0000285 组胃癌细胞迁移距离、侵袭数升高($P<0.05$),E-cadherin 蛋白表达降低($P<0.05$),N-cadherin 蛋白表达升高($P<0.05$)(图7)。

3 讨论

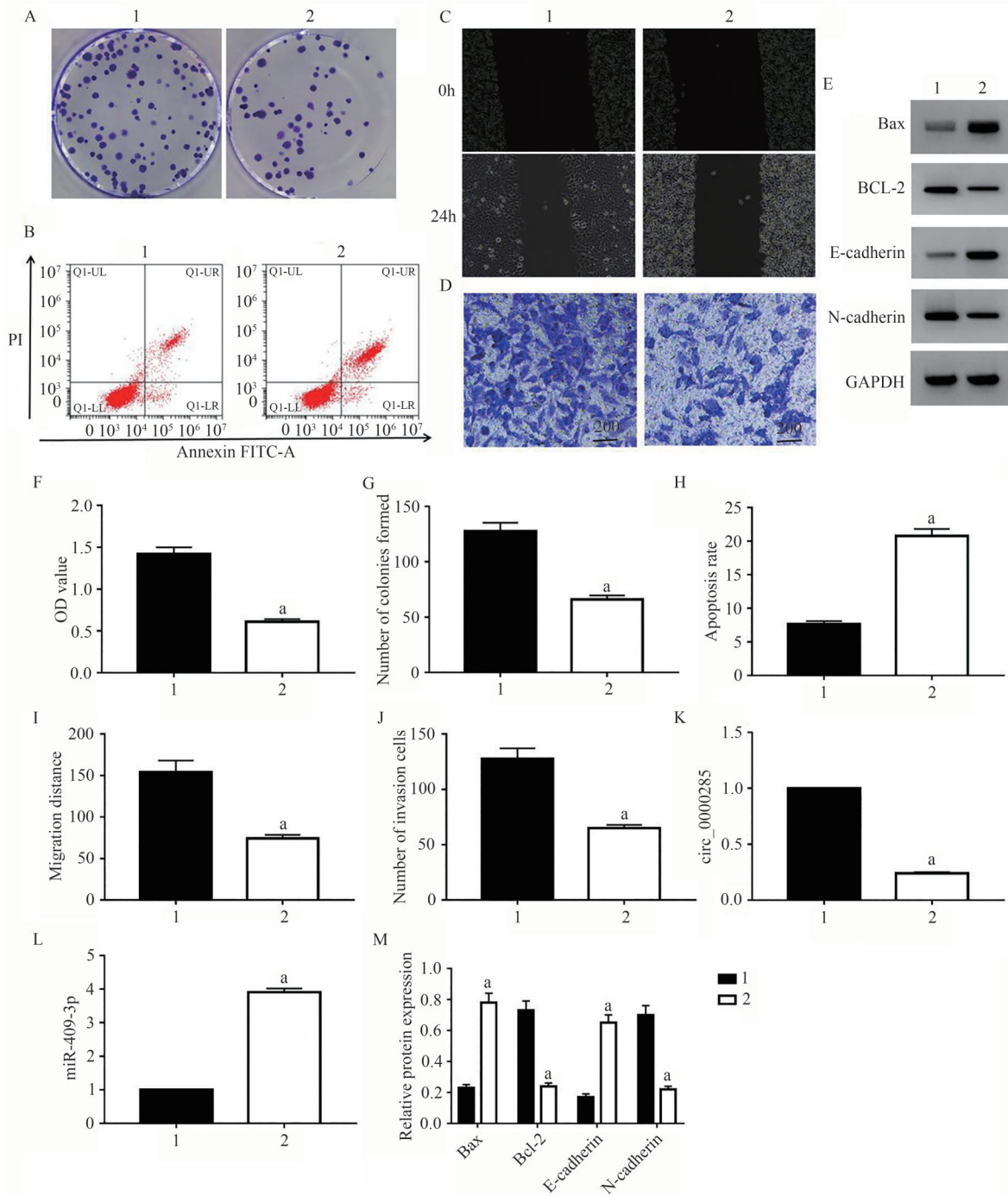
中药及其活性成分是抗癌药物的重要来源,目前,已有大量植物来源的化学成分如紫杉醇、人参皂苷等被成功应用于肿瘤的治疗。木香烯内酯作为中药木香的主要活性成分,具有一定的抗肿瘤作用。研究显示,木香烯内酯可诱导卵巢癌细胞凋亡,其对凋亡的促进作用是通过抑制 NF- κ B 表达和激活 Caspase-3、Caspase-9 实现的^[11];结直肠癌相关研究也显示,木香烯内酯可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路抑制病情进一步发展^[12],并促进细胞凋

亡^[13]。本研究结果显示,木香烯内酯可抑制胃癌细胞增殖,提示其对胃癌具有潜在治疗价值。

临床研究已证实,细胞生物学行为受多种基因的调控,其中,Bax/Bcl-2 参与了细胞活动的调控。Bax 在细胞凋亡信号的刺激下被激活,激活的 Bax 蛋白会形成同二聚体进入线粒体,使线粒体膜通透性发生变化,导致细胞凋亡诱导剂如细胞色素 C 的释放,进而激活凋亡执行蛋白 Caspase,引发细胞凋亡的级联反应;Bcl-2 蛋白可通过与 Bax 和其他促凋亡蛋白形成异二聚体抑制后者的活性,阻止细胞凋亡的发生^[14]。在上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程中,E-cadherin 等上皮标志物表达下调,N-cadherin 等间质标志物表达上调,从而改变细胞骨架,降低细胞黏附性,使其更易脱离病灶^[15-16]。本研究结果提示,木香烯内酯可能通过调控 Bax/Bcl-2 诱导胃癌细胞凋亡,通过抑制胃癌细胞 EMT 降低其迁移和侵袭能力。

circRNA 呈闭合环状,结构稳定,具有高度保守性。研究显示,circPDZD8^[17]、circRNA MCTP2^[18]等多种 circRNA 在胃癌中表达升高,可促进胃癌细胞恶性表型及化疗抗性;而 circ_0004872^[19]、circ-CUL2^[20]、circMTO1^[21]等在胃癌中表达降低,发挥抑癌基因作用,有作为胃癌治疗分子靶点的可能性。当前的结果表明,circ_0000285 可通过促进胃癌细胞增殖、迁移并抑制细胞凋亡,在胃癌中发挥促癌基因作用,具有作为胃癌治疗靶点的潜力。

为进一步探究 circ_0000285 影响胃癌细胞恶性表型的分子机制,本研究证实 circ_0000285 可靶向结合并负调控 miR-409-3p,与 Long 等^[22]报道的敲除 circ_0000285 可靶向上调 miR-409-3p 并抑制 IGFBP3 表达,抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭等恶性表型的结果一致。miRNA 通过靶向调控其靶基因的表达参与肿瘤的发展。研究发现,miR-409-3p 在骨肉瘤^[23]、神经胶质瘤^[24]和甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)^[25]中表达下调,过表达 miR-409-3p 可分别通过靶向抑制 E74 样因子 2 (E74-like factor 2, ELF2)、高迁移率核小体结合域 5 (high mobility group nucleosome-binding domain 5, HMG5) 和细胞周期蛋白 D2 (cyclin D2) 的表达抑制骨肉瘤、神经胶质瘤和 PTC 细胞的恶性行为。Wang 等^[26]报道,沉默 circ_0001023 可靶向 miR-409-3p,进而抑制 PHF10 的表达,阻止胃癌细胞增

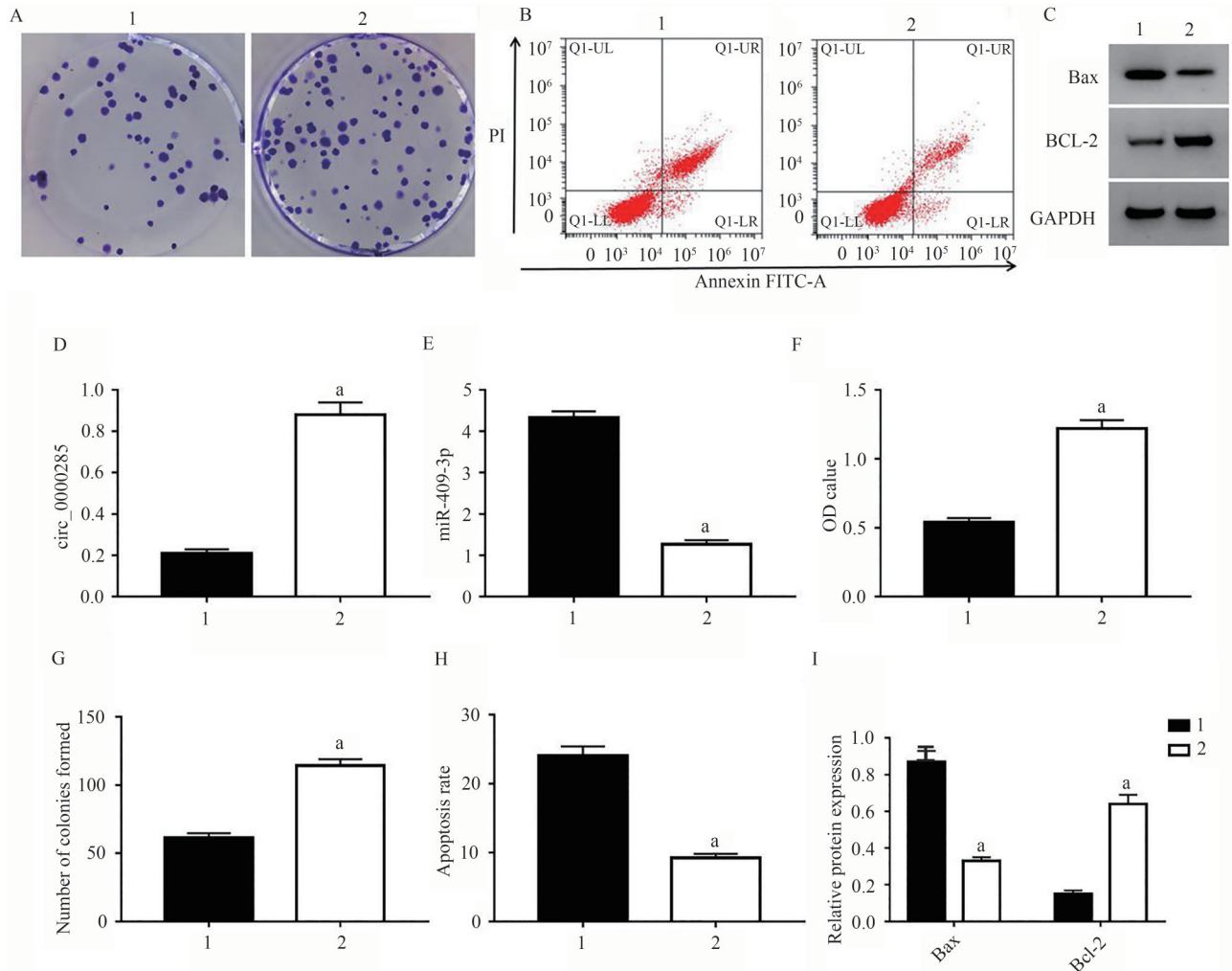


注：(1) si-NC 组；(2) si-circ_0000285 组。(A、G) 干扰 circ_0000285 对胃癌细胞集落形成的影响；(B、H) 干扰 circ_0000285 对胃癌细胞凋亡的影响；(C、I) 干扰 circ_0000285 对胃癌细胞迁移的影响；(D、J) 干扰 circ_0000285 对胃癌细胞侵袭的影响；(E、M) 干扰 circ_0000285 对胃癌细胞中 Bax、Bcl-2、E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达的影响；(F) 干扰 circ_0000285 对胃癌细胞活性的影响；(K) circ_000028 表达检测；(L) miR-409-3p 表达检测。与 si-NC 组相比，^a*P*<0.05。

Note: (1) si-NC group; (2) si-circ_0000285 group. (A, G) The effect of interference with circ_0000285 expression on the colony formation of gastric cancer cells; (B, H) The effect of interference with circ_0000285 expression on the apoptosis of gastric cancer cells; (C, I) The effect of interference with circ_0000285 expression on the migration of gastric cancer cells; (D, J) The effect of interference with circ_0000285 expression on the invasion of gastric cancer cells; (E, M) The effect of interference with circ_0000285 expression on the protein expressions of Bax, Bcl-2, E-cadherin and N-cadherin in gastric cancer cells; (F) The effect of interference with circ_0000285 expression on the activity of gastric cancer cells; (K) Detection of circ_000028 expression; (L) Detection of miR-409-3p expression. Compared with si-NC group, ^a*P*<0.05.

图 5 干扰 circ_0000285 对胃癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

Fig. 5 The effect of interference with circ_0000285 expression on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of gastric cancer cells



注：(1)木香桉内酯+pcDNA 组；(2)木香桉内酯+pcDNA-circ_0000285 组。(A、G) circ_0000285 逆转木香桉内酯对胃癌细胞集落形成的抑制作用；(B、H) circ_0000285 逆转木香桉内酯对胃癌细胞凋亡的诱导作用；(C、I) circ_0000285 逆转木香桉内酯对胃癌细胞中 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响；(D) circ_0000285 表达检测；(E) miR-409-3p 表达检测；(F) circ_0000285 逆转木香桉内酯对胃癌细胞活性的作用。与木香桉内酯+pcDNA 组相比，^a*P*<0.05。

Note: (1) Costunolide+pcDNA group; (2) Costunolide+pcDNA-circ_0000285 group. (A, G) circ_0000285 can reverse the inhibitory effect of costunolide on the colony formation of gastric cancer cells; (B, H) circ_0000285 can reverse the induction effect of costunolide on the apoptosis of gastric cancer cells; (C, I) circ_0000285 can reverse the effect of costunolide on the Bax and Bcl-2 protein expressions; (D) Detection of circ_0000285 expression; (E) Detection of miR-409-3p expression; (F) circ_0000285 can reverse the effect of costunolide on the activity of gastric cancer cells. Compared with costunolide+pcDNA group, ^a*P*<0.05.

图 6 过表达 circ_0000285 可逆转木香桉内酯对胃癌细胞增殖和凋亡的作用

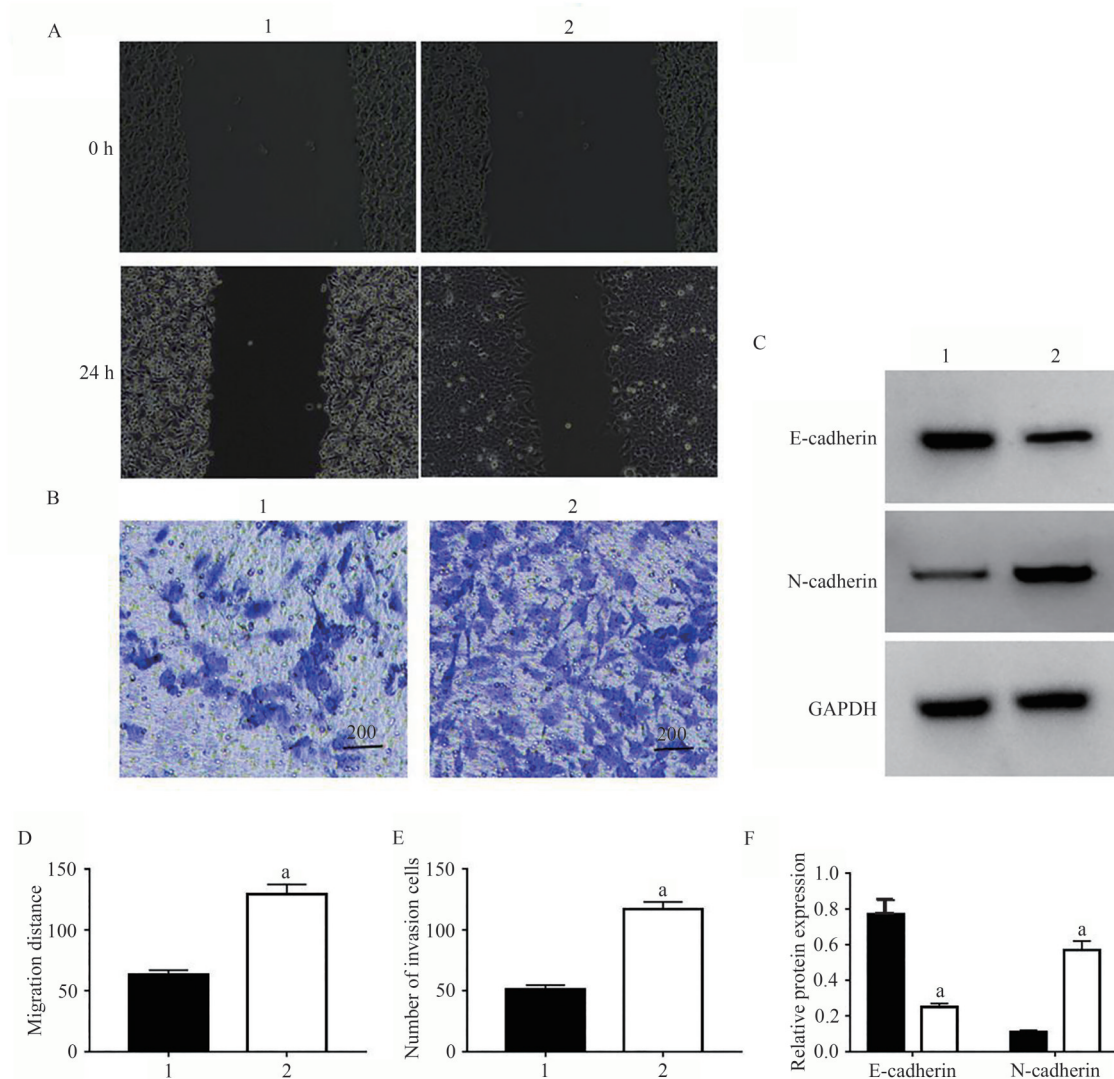
Fig. 6 Overexpression of circ_0000285 can reverse the effects of costunolide on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells

殖并促进细胞凋亡，miR-409-3p 可作为胃癌的治疗靶点。本研究显示，木香桉内酯可抑制胃癌细胞中 circ_0000285 的表达，促进 miR-409-3p 的表达，过表达 circ_0000285 可逆转木香桉内酯对胃癌细胞恶性表型的影响，提示木香桉内酯可能通过靶向 circ_0000285 并上调 miR-409-3p 来抑制胃癌细胞恶性表型，但其调控 miR-409-3p 的靶基因还有待进一步探究。

综上，木香桉内酯对胃癌细胞具有抑制作用，可通过靶向抑制 circ_0000285、上调 miR-409-3p 表达发挥抑癌作用，我们后续将进一步探究木香桉内酯影响胃癌细胞的其他途径，并通过动物实验验证木香桉内酯的抗胃癌作用。

参考文献

[1] 苏敏, 龚小见, 周欣. 中药有效成分抗宫颈癌作用机制的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(4): 675-684. DOI:



注:(1)木香烃内酯+pcDNA组;(2)木香烃内酯+pcDNA-circ_0000285组。(A、D) circ_0000285 逆转木香烃内酯对胃癌细胞迁移的抑制作用;(B、E) circ_0000285 逆转木香烃内酯对胃癌细胞侵袭的抑制作用;(C、F) circ_0000285 逆转木香烃内酯对胃癌细胞中 E-cadherin、N-cadherin 蛋白表达的影响。与木香烃内酯+pcDNA 组相比,^a*P*<0.05。

Note: (1) Costunolide+pcDNA group; (2) Costunolide+pcDNA-circ_0000285 group. (A, D) circ_0000285 can reverse the inhibitory effect of costunolide on the migration of gastric cancer cells; (B, E) circ_0000285 can reverse the inhibitory effect of costunolide on the invasion of gastric cancer cells; (C, F) circ_0000285 can reverse the inhibitory effect of costunolide on the protein expressions of E-cadherin and N-cadherin. Compared with costunolide+pcDNA group, ^a*P*<0.05.

图 7 过表达 circ_0000285 可逆转木香烃内酯对胃癌细胞迁移和侵袭的作用

Fig. 7 Overexpression of circ_0000285 can reverse the effects of costunolide on the migration and invasion of gastric cancer cells

10.19540/j.cnki.cjcm.20181220.002.

[2] 吴晓燕, 厉星. 木香烃内酯通过抑制 NLRP3 缓解 LPS 诱导小鼠巨噬细胞的炎症反应[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(12): 1433-1437. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2019.12.005.

[3] 马强, 熊书, 苗加伟, 等. 木香烃内酯对人乳腺癌 SK-BR-3 细胞增殖、迁移和凋亡的影响及机制研究[J]. 中国药房, 2020, 31(11): 1342-1347. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.11.10.

[4] 林雪晶, 刘春颖, 彭章晓, 等. 木香烃内酯对人胆管癌 RBE 细胞生物学行为的影响及其作用机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(7): 687-692. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.07.005.

[5] SHEN D, ZHAO H Y, ZENG P, et al. Circular RNA hsa_circ_0005556 accelerates gastric cancer progression by sponging miR-4270 to increase MMP19 expression [J]. *J Gastric Cancer*, 2020, 20(3): 300-312. DOI: 10.5230/jgc.2020.20.e28.

[6] WANG Z B, JIANG Z D, ZHOU J, et al. circRNA RNF111 regulates the growth, migration and invasion of gastric cancer cells by binding to miR-27b-3p [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(5): 1873-1885. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4709.

[7] ZHANG Z C, PU F F, WANG B C, et al. Hsa_circ_0000285 functions as a competitive endogenous RNA to promote osteosarcoma progression by sponging hsa-miRNA-599 [J]. *Gene Ther*, 2020, 27(5): 186-195. DOI: 10.1038/s41434-019-

- 0112-5.
- [8] ZHANG W M, ZHANG S P. Downregulation of circRNA_0000285 suppresses cervical cancer development by regulating miR197-3p-ELK1 axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 8663-8674. DOI: 10.2147/CMAR.S253174.
- [9] CHI B J, ZHAO D M, LIU L, et al. Downregulation of hsa_circ_0000285 serves as a prognostic biomarker for bladder cancer and is involved in cisplatin resistance [J]. *Neoplasma*, 2019, 66(2): 197-202. DOI: 10.4149/neo_2018_180318N185.
- [10] LI C L, NIE H, WANG M, et al. microRNA-409-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting PHF10 in gastric cancer [J]. *Cancer Lett*, 2012, 320(2): 189-197. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.02.030.
- [11] 石小燕, 刘嵘. 木香炔内酯诱导卵巢癌细胞凋亡机制研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(8): 817-820. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2018.08.006.
- [12] 吴文宇, 杨柱, 龙奉玺, 等. 木香炔内酯通过 PI3K/AKT 信号通路调控结肠癌细胞增殖、凋亡、侵袭和转移[J]. *中药材*, 2020, 43(2): 429-435. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2020.02.034.
- [13] 罗雪, 彭建明, 江秀玲. 木香炔内酯对肺癌细胞 A549 的凋亡作用及其机制[J]. *现代医药卫生*, 2018, 34(22): 3473-3475. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2018.22.015.
- [14] LI G, XU D X, SUN J J, et al. Paclitaxel inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of breast cancer cells by blocking activation of the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2020, 29(11): 1337-1345. DOI: 10.17219/acem/127681.
- [15] CHEN J, WANG X F, QIN Y C, et al. Downregulation of long non-coding RNA DUXAP10 inhibits proliferation, migration, and invasion of renal cell carcinoma [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(21): 11041-11051. DOI: 10.26355/eurrev_202011_23589.
- [16] ZHANG Q, LIU H F, ZHANG J, et al. miR-142-5p suppresses lung cancer cell metastasis by targeting Yin Yang 1 to regulate epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cell Reprogram*, 2020, 22(6): 328-336. DOI: 10.1089/cell.2020.0023.
- [17] XIA T F, PAN Z G, ZHANG J. circPDZD8 promotes gastric cancer progression by regulating CHD9 via sponging miR-197-5p [J]. *Aging*, 2020, 12(19): 19352-19364. DOI: 10.18632/aging.103805.
- [18] SUN G L, LI Z, HE Z Y, et al. Circular RNA MCTP2 inhibits cisplatin resistance in gastric cancer by miR-99a-5p-mediated induction of MTMR3 expression [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 246. DOI: 10.1186/s13046-020-01758-w.
- [19] MA C Y, WANG X Y, YANG F H, et al. Circular RNA hsa_circ_0004872 inhibits gastric cancer progression via the miR-224/Smad4/ADAR1 successive regulatory circuit [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 157. DOI: 10.1186/s12943-020-01268-5.
- [20] PENG L, SANG H M, WEI S C, et al. circCUL2 regulates gastric cancer malignant transformation and cisplatin resistance by modulating autophagy activation via miR-142-3p/ROCK2 [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 156. DOI: 10.1186/s12943-020-01270-x.
- [21] SONG R F, LI Y, HAO W W, et al. Circular RNA MTO1 inhibits gastric cancer progression by elevating PAWR via sponging miR-199a-3p [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(22): 3127-3139. DOI: 10.1080/15384101.2020.1834301.
- [22] LONG Z S, GONG F P, LI Y X, et al. circ_0000285 regulates proliferation, migration, invasion and apoptosis of osteosarcoma by miR-409-3p/IGFBP3 axis [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 481. DOI: 10.1186/s12935-020-01557-5.
- [23] ZHANG J, HOU W G, JIA J L, et al. miR-409-3p regulates cell proliferation and tumor growth by targeting E74-like factor 2 in osteosarcoma [J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7(3): 348-357. DOI: 10.1002/2211-5463.12177.
- [24] CAO Y D, ZHANG L, WEI M H, et al. microRNA-409-3p represses glioma cell invasion and proliferation by targeting high-mobility group nucleosome-binding domain 5 [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(7): 1097-1107. DOI: 10.3727/096504017x14836170586829.
- [25] ZHAO Z J, YANG F, LIU Y, et al. microRNA-409-3p suppresses cell proliferation and cell cycle progression by targeting cyclin D2 in papillary thyroid carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(4): 5237-5242. DOI: 10.3892/ol.2018.9246.
- [26] WANG Y X, ZHANG J B, CHEN X C, et al. circ_0001023 promotes proliferation and metastasis of gastric cancer cells through miR-409-3p/PHF10 axis [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 4533-4544. DOI: 10.2147/OTT.S244358.

校稿: 李征 王娟

本文引用格式: 刘昭, 郑志超, 张亚鹏, 等. 木香炔内酯通过调控 circ_0000285/miR-409-3p 影响胃癌细胞恶性表型[J]. *肿瘤药学*, 2024, 14(2): 193-202. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2024.02.09.

Cite this article as: LIU Zhao, ZHENG Zhichao, ZHANG Yapeng, et al. Costunolide affects the malignant phenotype of gastric cancer cells by regulating circ_0000285/miR-409-3p [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2024, 14(2): 193-202. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2024.02.09.