

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.05.007

余甘子提取物调控 LINC01772/miR-153 对肺癌细胞 A549 生物学行为的影响 *

张洪岩 刘欢 朱宝杰 范宜锋

(河北中石油中心医院放疗科 河北 廊坊 065000)

摘要 目的:探讨余甘子提取物对肺癌细胞 A549 增殖、迁移和侵袭的影响及机制。**方法:**体外培养 A549 细胞,分为对照组、不同剂量(低、中、高剂量)余甘子提取物组、si-NC 组、si-LINC01772 组、高剂量余甘子提取物+pcDNA 组和高剂量余甘子提取物+pcDNA-LINC01772 组,细胞计数试剂盒(CCK-8)法和克隆形成实验检测细胞增殖,划痕实验检测细胞迁移,嵌入式细胞共培养法(Transwell)检测细胞侵袭,免疫印迹法(Western Blot)检测细胞中上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)和神经型钙黏蛋白(N-cadherin)蛋白表达水平,实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 LINC01772 和 miR-153 表达水平。双荧光素酶报告基因实验验证 LINC01772 和 miR-153 调控关系。**结果:**与对照组相比,不同剂量余甘子提取物组 A549 细胞中 LINC01772 表达降低,且光密度值(OD 值)、克隆形成数、迁移以及侵袭细胞数减少($P<0.05$),而 miR-153 含量与 E-cadherin 蛋白表达升高($P<0.05$),且呈剂量依赖性($P<0.05$)。LINC01772 在 A549 细胞中负调控 miR-153 表达。与 si-NC 组相比,si-LINC01772 组 A549 细胞增殖,侵袭及迁移能力受到抑制($P<0.05$)。与高剂量余甘子提取物+pcDNA 组相比,高剂量余甘子提取物+pcDNA-LINC01772 组 A549 细胞增殖,侵袭及迁移能力增强($P<0.05$)。**结论:**余甘子提取物可能通过调控 LINC01772/miR-153 轴抑制肺癌细胞 A549 增殖、迁移和侵袭,其可能通过下调 LINC01772 进而上调 miR-153 表达发挥作用,具有开发为治疗肺癌药物的潜在价值。

关键词:余甘子提取物;肺癌;LINC01772;miR-153;细胞增殖;细胞迁移;细胞侵袭

中图分类号:R-33;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)05-841-08

Effect of Phyllanthus Emblica Extract on the Biological Behavior of Lung Cancer Cell A549 by Regulating LINC01772 / miR-153*

ZHANG Hong-yan, LIU Huan, ZHU Bao-jie, FAN Yi-feng

(Department of Radiotherapy, Hebei China Petroleum Central Hospital, Langfang, Hebei, 065000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and mechanism of phyllanthus emblica extract on proliferation, migration and invasion of lung cancer cell A549. **Methods:** A549 cells were cultured in vitro and divided into control group, different doses (low, medium and high doses) phyllanthus emblica extract group, si-NC group, si-LINC01772 group, high dose phyllanthus emblica extract+pcDNA group and high dose phyllanthus emblica extract+pcDNA-LINC01772 group. Cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) and clone formation assay. Cell migration was detected by scratch assay. Cell invasion was detected by Transwell assay. The expression levels of E-cadherin and N-cadherin in the cells were detected by Western Blot, and the expression levels of LINC01772 and miR-153 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). The regulatory relationship between LINC01772 and miR-153 was verified through the dual luciferase reporter gene assay. **Results:** Compared with the control group, the expression of LINC01772 in A549 cells in different doses of phyllanthus emblica extract groups was decreased, and the optical density (OD value), number of clone formation, migration and invasion cells were decreased ($P<0.05$), while the content of miR-153 and the expression of E-cadherin protein were increased ($P<0.05$), with a dose-dependent manner ($P<0.05$). LINC01772 negatively regulated miR-153 expression in A549 cells. Compared with the si-NC group, the proliferation, invasion and migration of A549 cells in the si-LINC01772 group were inhibited ($P<0.05$). Compared with the high dose phyllanthus emblica extract+pcDNA group, the proliferation, invasion and migration of A549 cells in the high dose phyllanthus emblica extract+pcDNA-LINC01772 group were enhanced ($P<0.05$). **Conclusion:** Phyllanthus emblica extract may inhibit the proliferation, migration and invasion of lung cancer cell A549 by regulating the LINC01772/miR-153 axis, which may play a role by down-regulating LINC01772 and up-regulating the expression of miR-153, and has the potential value to be developed as a drug for the treatment of lung cancer.

Key words: Phyllanthus emblica extract; Lung cancer; LINC01772; miR-153; Cell proliferation; Cell migration; Cell invasion

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)05-841-08

* 基金项目:河北省科学技术研究项目(20201217);2018 年廊坊市科技支撑计划项目(2018013158)

作者简介:张洪岩(1982-),男,硕士,主治医师,研究方向:肿瘤学,E-mail: zhanghy820109@163.com

(收稿日期:2023-09-04 接受日期:2023-09-30)

前言

肺癌是常见的恶性的肿瘤,主要治疗方法包括手术治疗以及放化疗等,但这些方法具有一定局限性和较大副作用^[1,2],因此,亟需寻找新的高效且副作用低的抗肿瘤药物。余甘子属大戟科叶下珠属植物,其成熟果实酸甜酥脆且微涩,回味甘甜,具有清热凉血、消食健胃、生津止咳的功效^[3]。近年来研究还表明,余甘子可以阻碍致癌物质亚硝基化合物的合成,具有抗氧化,抗菌作用,抗炎作用,可以调节细胞周期调节和致癌信号基因;此外,余甘子里面含有丰富的抗癌的有效成分维生素 C,因此余甘子被认为是很好的抗癌药物^[4,5],但目前,余甘子是否发挥抗肺癌作用和机制尚需进一步研究。长链非编码 RNA(lncRNA)和微小 RNA(miRNA)是两类小分子非编码 RNA,已被证实可以参与调控与细胞生长,转移有关的多种生命活动,且两者存在相互作用,在肿瘤的发生发展中起重要作用^[6,7]。LINC01772 属于一种 lncRNA,研究显示,其在宫颈癌中表达升高,通过与 miR-3611 竞争性结合促进 ZEB1 的表达来促进宫颈癌细胞迁移和 EMT 过程^[8]。但目前,LINC01772 对肺癌细胞恶性生物学行为的影响尚不明确。生物在线软件预测显示,LINC01772 可能与 miR-153 存在相互作用。研究显示,miR-153 在肺癌组织中表达降低,其低表达与肺癌患者的肺转移和预后不良密切相关,其通过靶向调控 Jagged1/Notch1 轴抑制肺腺癌肿瘤生长^[9]。因此,本研究以肺癌细胞 A549 为研究对象,LINC01772/miR-153 轴为切入点,探讨了余甘子提取物对 A549 细胞增殖、迁移和侵袭的影响和机制。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

肺癌细胞系 A549,中国科学院上海细胞库;余甘子干燥果实,亳州中药材商品交易中心;RPMI 1640 培养基、细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 和 Lipofectamine™ 2000 试剂盒,胎牛血清(FBS),北京索莱宝科技有限公司;Trizol 试剂,美国 Invitrogen 公司;PCR 引物、LINC01772 的小干扰 RNA(si-LINC01772)及乱序无意义阴性序列(si-NC)、miR-153 模拟物(mimics)及模拟对照序列(miR-NC)、LINC01772 过表达载体(pcDNA-LINC01772)及空载体(pcDNA)、LINC01772 野生型质粒(WT-LINC01772)及突变型质粒(MUT-LINC01772),上海吉玛制药技术有限公司;逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒,深圳晶美生物工程有限公司;兔抗人上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体,北京中杉金桥生物技术有限公司;双荧光素酶活性检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 余甘子提取物制备 将余甘子洗净、去核,50℃烘干,过 200 目筛。准确称取 50 g 干燥粉末,加 500 mL 70%乙醇,70℃加热回流 3 次,每次 90 min。抽滤,合并滤液,旋转蒸发浓缩至约 5 mL,冷冻干燥。使用培养基配置为 1 mg/mL 的母液,使用时稀释至所需浓度^[10]。

1.2.2 细胞培养和转染 在含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养 A549 细胞。采用传代 3~5 代的细胞进行研究。采用

Lipofectamine™ 2000 法分别转染 si-NC、si-LINC01772、pcDNA 和 pcDNA-LINC01772。6 h 后,更换培养基。继续培养 24 h 后收集细胞用于后续实验。

1.2.3 分组处理 A549 细胞分别在含有 50、100、200 μg/mL 余甘子提取物的培养基中培养,记为低、中、高剂量余甘子提取物组;未经处理的细胞为对照组。A549 细胞分别转染 si-NC 或 si-LINC01772,记为 si-NC 组、si-LINC01772 组。转染 pcDNA、pcDNA-LINC01772 的细胞用含 200 μg/mL 余甘子提取物的培养基培养,记为高剂量余甘子提取物+pcDNA 组、高剂量余甘子提取物+pcDNA-LINC01772 组。

1.2.4 CCK-8 实验 收集各组处理后的细胞,将细胞接种于 96 孔板中,每孔 5000 个细胞。在孵育 0、24、48、72 h 时,将 10 μL CCK8 溶液加入到每孔中。再孵育 2 h 后,于酶标仪 450 nm 处测光密度(OD)值。

1.2.5 克隆形成实验 将培养到 80%融合度的细胞进行胰蛋白酶化,重悬,并按照每孔 1000 个细胞的密度将细胞接种于 6 孔板中。培养两周后,用甲醇(4%)固定菌落 30 分钟,PBS 洗涤,结晶紫(0.1%)染色。最后显微镜计数细胞菌落数。

1.2.6 划痕实验检测细胞迁移 收集各组处理后的细胞,按照每孔 5000 个细胞的密度将细胞接种于 6 孔板中,当细胞基本融合为单层时,用 200 μL 枪头沿孔中轴线垂直划痕,PBS 溶液洗去划掉的细胞,显微镜 200×测量划痕宽度。培养 24 h,再次测量划痕处细胞宽度,随后计算划痕迁移数。

1.2.7 嵌入式细胞共培养法(Transwell)检测细胞侵袭 Transwell 小室置于 24 孔板中,在 transwell 的上腔中加入 matrigel,固定一小时。将细胞调整为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,取 100 μL 加入至 Transwell 上室。Transwell 下室加 500 μL 培养基。培养 24 h 后,将粘附于小室下表面的侵袭细胞用 4%甲醇固定 0.5 h,结晶紫(0.1%)染色 15 min。最后随机选取 5 个视野,观察并计算侵袭细胞的数量。

1.2.8 免疫印迹法(Western Blot) 用 RIPA 裂解缓冲液在 4℃下裂解细胞提取总蛋白。根据每个目标蛋白的分子量,使用 12%或 5%的 SDS-PAGE 分离总蛋白。应用在 TBST 缓冲液中稀释的 5%无脂牛奶将经 SDS-PAGE 分离后的蛋白质转移并封闭到 PVDF 膜。将 E-cadherin、N-cadherin 和 GAPDH 抗体在 4℃下与 PVDF 膜孵育过夜,随后与第二抗体 37℃孵育 1 小时。采用 ECL 试剂盒检测蛋白条带信号强度,Image J 软件分析蛋白相对水平。

1.2.9 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 按照 1.2.2 分组处理后,细胞以 5.0×10^3 个/孔接种于 96 孔板中。Trizol 试剂提取总 RNA,逆转录为 cDNA 后行 PCR 扩增。扩增条件:95℃3 min, 95℃15 s, 60℃30 s, 72℃30 s, 共 35 个循环。引物序列: LINC01772 上游 5'-TGTCATGTTGTGTGAGC TGC-3', 下游 5'-TGTTGTGCTGGGAGTGATCA-3'; miR-153 上游 5'-CCGAGTCTTCTGCAAC CCG-3', 下游 5'-CGAAATCTAACGTCGACCTGT-3'; GAPDH 上游 5'-AGTGTGACGACGAA CA-GAGG-3', 下游 5'-GGTGGAGTCGTACTGGAACA-3'; U6 上游 5'-GTCAACAGATGCCG TAGCT-3', 下游 5'-GTGGTCCC-GAACGCTGACTG-3'。2^{-ΔΔCt} 法计算 LINC01772 和 miR-153 水平,LINC01772 以 GAPDH 为内参,miR-153 以 U6 为内参。

1.2.10 双荧光素酶报告实验 将预测的含有 miR-153 互补序列的野生型 (WT) LINC01772 片段扩增并克隆到 psiCHECK-2 载体中, 记为 WT-LINC01772。随后采用点突变将片段突变并克隆到载体, 记为 MUT-LINC01772。随后应用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒分别将 WT-LINC01772 或 MUT-LINC01772 与 miR-153 mimics 或 miR-NC 转染于 A549 细胞。48 h 后, 使用双荧光素酶报告试剂盒评估荧光素酶活性。

1.3 统计学分析

SPSS.22.0 软件分析实验数据。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,

进一步两两比较采用 SNK- q 检验; 两组间比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 余甘子提取物对 A549 细胞增殖的影响

相较于对照组, 不同剂量余甘子提取物组 A549 细胞 OD 值和克隆形成数均降低($P<0.05$), 且不同剂量余甘子提取物组 A549 细胞 OD 值和克隆形成数两两比较差异显著($P<0.05$)。见图 1、表 1。

表 1 余甘子提取物对 A549 细胞 OD 值和克隆形成数的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Effects of phyllanthus emblica extract on OD value and clone formation number of A549 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

Groups	OD value	Clone formation number(n)
Control group	1.01 $\pm$ 0.04	122.33 $\pm$ 2.49
Low dose phyllanthus emblica extract group	0.80 $\pm$ 0.03*	103.00 $\pm$ 2.16*
Medium dose phyllanthus emblica extract group	0.58 $\pm$ 0.02**	82.67 $\pm$ 1.70**
High dose phyllanthus emblica extract group	0.36 $\pm$ 0.02***	55.67 $\pm$ 1.25***
F	285.424	637.970
P	0.000	0.000

Note: Compared with the control group, * $P<0.05$; Compared with the low dose phyllanthus emblica extract group, ** $P<0.05$; Compared with the medium dose phyllanthus emblica extract group, *** $P<0.05$.

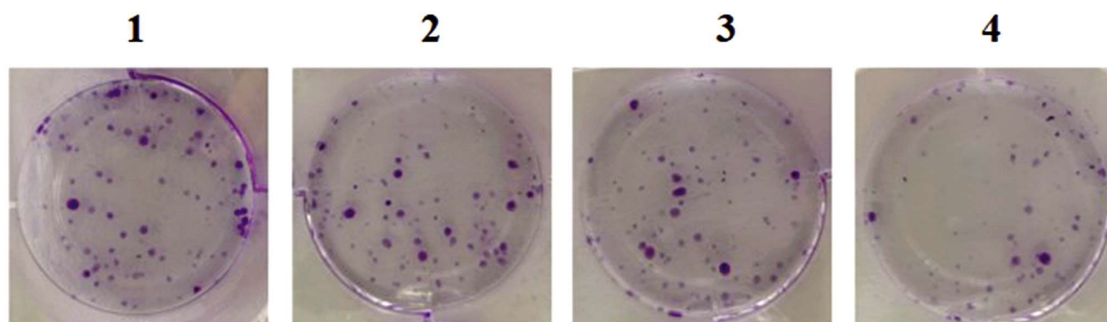


图 1 余甘子提取物对 A549 细胞克隆形成的影响

Fig.1 Effect of phyllanthus emblica extract on clone formation of A549 cells

Note: 1: Control group; 2: Low dose phyllanthus emblica extract group;

3: Medium dose phyllanthus emblica extract group; 4: High dose phyllanthus emblica extract group.

2.2 余甘子提取物对 A549 细胞迁移和侵袭的影响

与对照组相比, 不同剂量余甘子提取物组 A549 细胞划痕愈合率、侵袭细胞数及 N-cadherin 蛋白表达降低($P<0.05$), E-cadherin 蛋白表达上调($P<0.05$), 且不同剂量组之间差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 2、表 2。

2.3 余甘子提取物对 A549 细胞 LINC01772 和 miR-153 表达的影响

与对照组相比, 不同剂量余甘子提取物组 A549 细胞 LINC01772 表达降低($P<0.05$), miR-153 表达升高($P<0.05$), 且不同剂量余甘子提取物组各检测指标两两比较差异显著($P<0.05$)。表 3。

2.4 LINC01772 靶向调控 miR-153 表达

LINC01772 与 miR-153 的结合位点见图 3。miR-153

mimics 可降低 WT-LINC01772 的荧光素酶活性($P<0.05$), 但不影响 MUT-LINC01772 组的荧光素酶活性($P>0.05$), 见表 4。

2.5 下调 LINC01772 对 A549 细胞增殖的影响

与 si-NC 组相比, si-LINC01772 组 A549 细胞中 LINC01772 表达降低($P<0.05$), miR-153 表达升高($P<0.05$), 细胞 OD 值和克隆形成数均降低($P<0.05$)。见图 4、表 5。

2.6 下调 LINC01772 对 A549 迁移和侵袭的影响

与 si-NC 组相比, si-LINC01772 组 A549 细胞划痕愈合率、侵袭细胞数及 N-cadherin 蛋白表达降低($P<0.05$), E-cadherin 蛋白表达升高($P<0.05$)。见图 5、表 6。

2.7 上调 LINC01772 对余甘子提取物处理的 A549 细胞增殖的影响

与高剂量余甘子提取物 + pcDNA 组相比, 与高剂量余

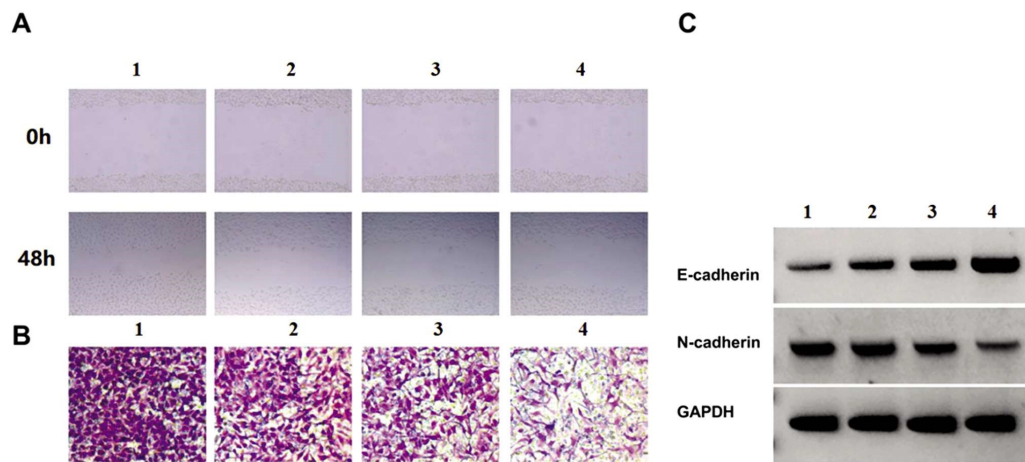


图 2 余甘子提取物对 A549 细胞迁移和侵袭的影响

Fig.2 Effects of Phyllanthus emblica extract on migration and invasion of A549 cells

Note: 1: Control group; 2: Low dose phyllanthus emblica extract group; 3: Medium dose phyllanthus emblica extract group; 4: High dose phyllanthus emblica extract group. A: Effect of phyllanthus emblica extract on scratch healing rate of A549 cells(100); B: Effect of phyllanthus emblica extract on invasion of A549 cells(200); C: Effect of phyllanthus emblica extract on the expression of N-cadherin and E-cadherin in A549 cells.

表 2 余甘子提取物对 A549 细胞迁移和侵袭的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of phyllanthus emblica extract on migration and invasion of A549 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

Groups	Scratch healing rate(%)	Invasive cells number(n)	E-cadherin	N-cadherin
Control group	56.79±1.30	199.67±4.99	0.23±0.02	0.82±0.04
Low dose phyllanthus emblica extract group	48.83±1.12*	167.67±3.68*	0.36±0.03*	0.65±0.03*
Medium dose phyllanthus emblica extract group	36.81±1.07**	130.33±3.30**	0.56±0.04**	0.41±0.02**
High dose phyllanthus emblica extract group	27.13±1.13***	86.00±2.45***	0.73±0.04***	0.22±0.01***
<i>F</i>	382.272	520.147	129.244	278.533
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the control group, * $P<0.05$; Compared with the low dose phyllanthus emblica extract group, ** $P<0.05$; Compared with the medium dose phyllanthus emblica extract group, *** $P<0.05$.

表 3 余甘子提取物对 A549 细胞 LINC01772 和 miR-153 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of phyllanthus emblica extract on the expression of LINC01772 and miR-153 in A549 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

Groups	LINC01772	miR-153
Control group	0.98±0.04	0.96±0.04
Low dose phyllanthus emblica extract group	0.78±0.03*	1.38±0.05*
Medium dose phyllanthus emblica extract group	0.53±0.02**	1.68±0.06**
High dose phyllanthus emblica extract group	0.32±0.02***	2.08±0.08***
<i>F</i>	301.909	190.723
<i>P</i>	0.000	0.000

Note : Compared with the control group, * $P<0.05$; Compared with the low dose phyllanthus emblica extract group, ** $P<0.05$; Compared with the medium dose phyllanthus emblica extract group, *** $P<0.05$.

甘子提取物 +pcDNA-LINC01772 组 A549 细胞中 miR-153 表达降低($P<0.05$),细胞 OD 值和克隆形成数均升高($P<0.05$)。见图 6、表 7。

2.8 上调 LINC01772 对余甘子提取物处理的 A549 迁移和侵袭的影响

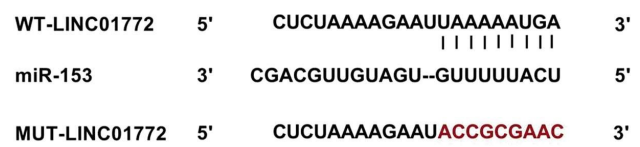


图 3 LINC01772 靶向 miR-153

Fig. 3 LINC01772 targets miR-153

与高剂量余甘子提取物 +pcDNA 组相比,与高剂量余甘子 胞数及 N-cadherin 蛋白表达升高 ($P<0.05$),E-cadherin 蛋白表
提取物 +pcDNA-LINC01772 组 A549 细胞划痕愈合率、侵袭细 达降低($P<0.05$)。见图 7、表 8。

表 4 双荧光素酶报告实验($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Dual-luciferase reporter assay($\bar{x}\pm s, n=3$)

Groups	WT-LINC01772	MUT-LINC01772
miR-NC	0.94±0.04	0.94±0.04
miR-153	0.31±0.02*	0.98±0.03
t	24.400	1.386
P	0.000	0.238

Note: Compared with the miR-NC group,* $P<0.05$.

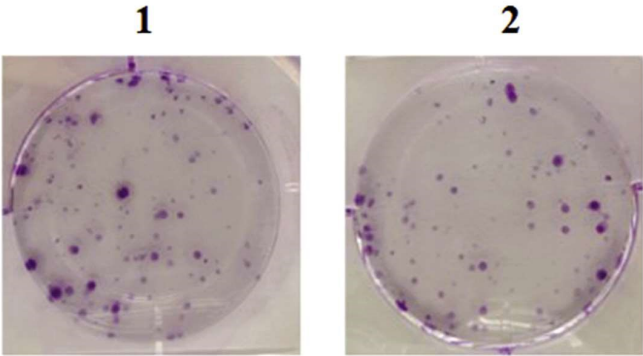


图 4 下调 LINC01772 对 A549 细胞克隆形成的影响

Fig.4 Effects of down-regulation of LINC01772 on colony formation of A549 cells

表 5 下调 LINC01772 对 A549 细胞 OD 值和克隆形成的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 5 Effects of down-regulation of LINC01772 on OD value and clone formation of A549 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

Groups	LINC01772	miR-153	OD value	Clone formation number(n)
si-NC	0.99±0.04	0.99±0.04	1.01±0.04	122.67±2.36
si-LINC01772	0.23±0.02*	1.84±0.07*	0.49±0.02*	63.00±1.41*
t	29.435	18.261	20.140	37.594
P	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the si-NC group,* $P<0.05$.

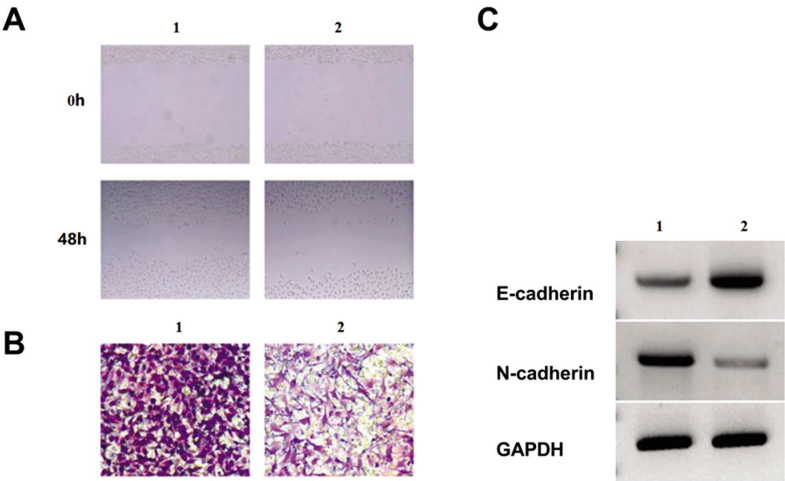


图 5 下调 LINC01772 对 A549 迁移和侵袭的影响

Fig.5 Effects of down-regulation of LINC01772 on migration and invasion of A549 cells

Note:1: si-NC; 2: si-LINC01772. A: Effect of down-regulation of LINC01772 on scratch healing rate of A549 cells($\times 100$);
B: Effect of down-regulation of LINC01772 on the invasion of A549 cells($\times 200$);
C: Effect of down-regulation of LINC01772 on the expression of N-cadherin and E-cadherin in A549 cells.

表 6 下调 LINC01772 对 A549 细胞迁移和侵袭的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effects of down-regulation of LINC01772 on migration and invasion of A549 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

Groups	Scratch healing rate(%)	Invasive cells number(n)	E-cadherin	N-cadherin
si-NC	56.79±1.29	199.67±4.92	0.23±0.01	0.84±0.04
si-LINC01772	32.44±1.07*	95.33±2.87*	0.63±0.03*	0.34±0.02*
<i>t</i>	25.164	31.728	21.909	19.365
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the si-NC group,* $P<0.05$.

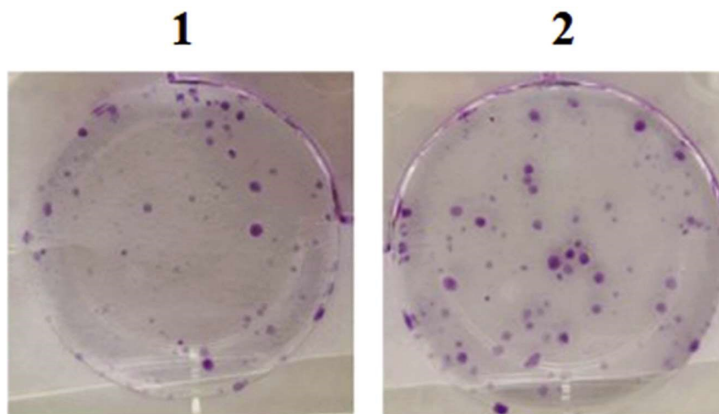


图 6 上调 LINC01772 对余甘子提取物处理的 A549 克隆形成的影响

Fig.6 Effects of up-regulation of LINC01772 on clone formation of A549 cells treated with phyllanthus emblica extract

Note: 1: High dose phyllanthus emblica extract+pcDNA group; 2: High dose phyllanthus emblica extract+pcDNA-LINC01772 group.

表 7 上调 LINC01772 对余甘子提取物处理的 A549 细胞 OD 值和克隆形成的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effects of up-regulation of LINC01772 on OD value and colony formation of A549 cells treated with phyllanthus emblica extract($\bar{x}\pm s, n=3$)

Groups	miR-153	OD value	Clone formation number(n)
High dose phyllanthus emblica extract+pcDNA group	2.10±0.06	0.35±0.02	56.33±1.25
High dose phyllanthus emblica extract+pcDNA-LINC01772 group	1.19±0.05*	0.84±0.03*	112.00±2.16*
<i>t</i>	20.181	23.539	38.637
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with high dose phyllanthus emblica extract+pcDNA group,* $P<0.05$.

3 讨论

天然植物或中草药因资源丰富、疗效强、低毒等特性,是抗肿瘤药物研究的重点之一^[11,12]。余甘子其富含黄酮、多酚、生物碱等多种活性成分,临床中常用于治疗高尿酸血症和痛风。研究还显示,余甘子具有抗氧化、抗炎等功效^[13,14]。近年来,余甘子的抗肿瘤作用备受关注。马美等^[15]研究显示,余甘子可能通过上调 CyclinG2 和 p21 的表达抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞体外增殖,并将细胞周期阻滞在 G1/S 期。罗兰等^[16]研究显示,余甘子醇提物可在体外抑制人胃癌 AGS 细胞生长及诱导细胞凋亡。但目前,余甘子是否具有抗肺癌的作用还尚不明确。

本研究显示,余甘子提取物可抑制肺癌细胞 A549 增殖、迁移和侵袭,且具有剂量依赖性。上皮间质转化(EMT)指上皮细胞受外界刺激后向间质细胞转化,在这一过程中,上皮细胞失去极性,迁移和运动能力增强,同时上皮表型丢失而逐渐获

得间质表型^[17]。目前认为,EMT 是肿瘤细胞发生侵袭和转移的关键启动环节^[18]。EMT 的标志是 N-cadherin 蛋白上调,E-cadherin 蛋白下调,EMT 转换可增强转移、药物耐药性以及肿瘤干性,是肿瘤发生的关键驱动因素^[19]。本研究显示,余甘子提取物可抑制 A549 细胞中 N-cadherin 蛋白表达,而促进 E-cadherin 蛋白表达,说明余甘子提取物可抑制 A549 细胞的上皮间质转化过程,进一步说明其可减弱 A549 细胞的迁移和侵袭能力。

目前,多种 lncRNAs 已被证实在肿瘤中差异表达,且参与肿瘤细胞的转移和生长。作为一种 lncRNA,目前有关 LINC01772 影响肿瘤中发生发展报道还很少见。有报道称,LINC01772 在肝细胞癌(HCC)患者的癌组织中表达升高,其高表达与患者TNM 分期和无进展生存期密切相关,是判断 HCC 预后的潜在生物学标志物^[20]。但是,还未见 LINC01772 影响肺癌发生发展的相关报道。在本次实验中,通过敲除实验发现敲低 LINC01772 后可抑制肺癌细胞 A549 的增殖、迁移和侵袭的

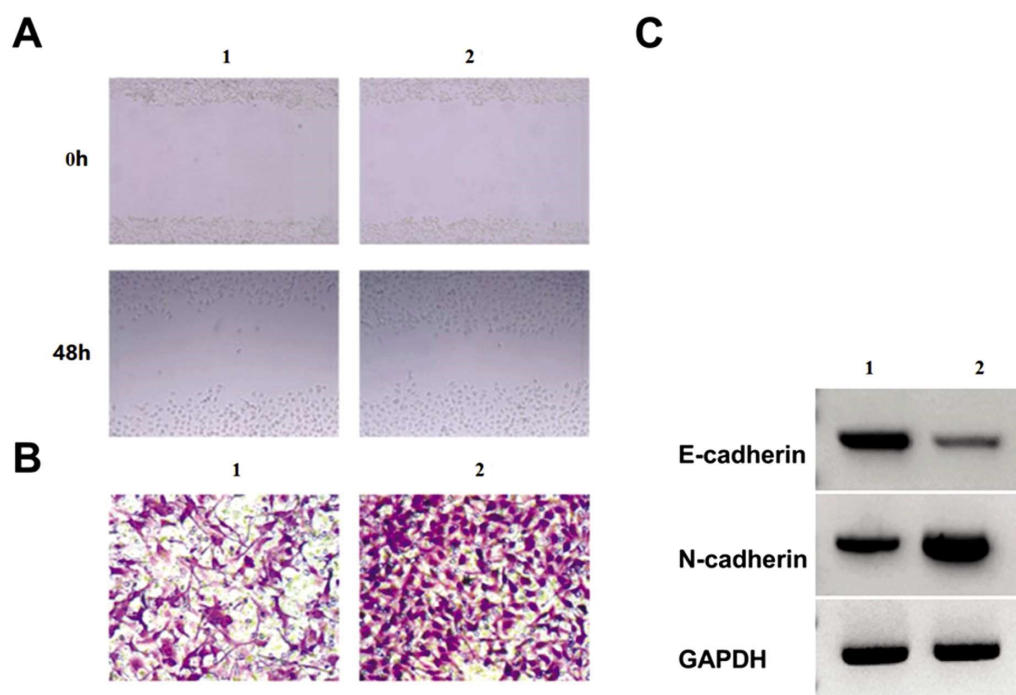


图 7 上调 LINC01772 对余甘子提取物处理的 A549 迁移和侵袭的影响

Fig.7 Effect of up-regulation of LINC01772 on migration and invasion of A549 treated with Phyllanthus emblica extract

Note: 1: High dose phyllanthus emblica extract+pcDNA group; 2: High dose phyllanthus emblica extract+pcDNA-LINC01772 group.

A: Effect of up-regulation of LINC01772 on the scratch healing rate of A549 cells treated with phyllanthus emblica extract($\times 100$);B: Effect of up-regulation of LINC01772 on the invasion of A549 cells treated with phyllanthus emblica extract($\times 200$);

C: Effect of up-regulation of LINC01772 on the expression of N-cadherin and E-cadherin protein in A549 cells treated with phyllanthus emblica extract.

表 8 上调 LINC01772 对余甘子提取物处理的 A549 细胞迁移和侵袭的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 8 Effect of up-regulation of LINC01772 on migration and invasion of A549 treated with Phyllanthus emblica extract($\bar{x} \pm s, n=3$)

Groups	Scratch healing rate(%)	Invasive cells number(n)	E-cadherin	N-cadherin
High dose phyllanthus emblica extract+pcDNA group	27.17 $\pm$ 1.08	86.67 $\pm$ 2.62	0.73 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.02
High dose phyllanthus emblica extract+pcDNA-LINC01772 group	52.00 $\pm$ 1.25*	177.33 $\pm$ 3.86*	0.25 $\pm$ 0.02*	0.72 $\pm$ 0.03*
<i>t</i>	26.034	33.659	18.590	24.500
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with high dose phyllanthus emblica extract+pcDNA group, * $P < 0.05$.

能力,提示 LINC01772 促进肺癌发生发展,靶向下调其表达可达到治疗肺癌或延缓肺癌发生发展的作用。因此采用 siRNA 下调 LINC01772 的表达可能是一种新的肺癌治疗策略。此外,近些年来有研究表明一些中药的生物活性成分可以靶向各种非编码 RNA 分子,包括 miRNA、lncRNA 和 circRNA,它们已成为包括癌症在内多种疾病的治疗靶点。例如,消痰散结汤通过下调 lncRNA-ATB 的表达抑制胃癌细胞增殖、侵袭和迁移^[21]。中华猕猴桃提取物通过抑制 E2F 转录因子 1 介导的 lncRNA MNX1-AS1 的表达抑制咽癌的生长和转移^[22]。随后本研究还显示,余甘子提取物可抑制 A549 细胞中 LINC01772 的表达,且上调 LINC01772 可以逆转余甘子提取物介导的抗癌作用,提示余甘子提取物通过下调 LINC01772 表达发挥抗肺癌作用,表明余甘子结合 LINC01772 siRNA 可能是治疗肺癌的新策略。

LncRNA 可通过靶向结合 miRNA, 调控其下游 mRNA 的

表达,进而影响肿瘤细胞的生命活动^[23,24]。miR-153 作为抑癌基因参与包括胃癌^[25],甲状腺癌^[26],乳腺癌^[27]等多种癌症的发生发展。本研究证实 LINC01772 靶向调控 miR-153 的表达,且下调 A549 细胞中 LINC01772 表达后,miR-153 的表达明显升高,表明 LINC01772 在 A549 细胞中负调控 miR-153 表达,这与余甘子提取物抑制 A549 细胞中 LINC01772 表达,而促进 miR-153 表达的结果一致。本研究还显示,余甘子提取物作用于过表达 LINC01772 的 A549 细胞后,细胞中 miR-153 表达降低,进一步提示余甘子提取物通过下调 LINC01772 进而上调 miR-153 表达来抑制 A549 增殖、迁移和侵袭。

综上所述,余甘子提取可抑制肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,其可能通过下调 LINC01772 进而上调 miR-153 表达发挥作用,具有开发为治疗肺癌药物的潜在价值。然而,具体是余甘子哪种提取物发挥主要作用仍需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention[J]. Clin Chest Med, 2020, 41(1): 1-24.
- [2] 张连民,岳东升,张真发,等. 非小细胞肺癌的外科及围手术期治疗研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2021, 48(10): 488-494.
- [3] 何志贵,杜密英,徐祥林,等. 基于网络药理学的余甘子保健作用机制研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2023, 51(4): 137-146.
- [4] 杨婉媛,陈晓维,刘杜娟,等. 余甘子的生物活性及加工研究进展[J]. 广东农业科学, 2022, 49(7): 120-130.
- [5] Kumar G, Madka V, Pathuri G, et al. Molecular Mechanisms of Cancer Prevention by Gooseberry (*Phyllanthus emblica*) [J]. Nutr Cancer, 2022, 74(7): 2291-2302.
- [6] Zhang P, Ha M, Li L B, et al. MicroRNA-3064-5p sponged by MALAT1 suppresses angiogenesis in human hepatocellular carcinoma by targeting the FOXA1/CD24/Src pathway [J]. FASEB J, 2020, 34(1): 66-81.
- [7] Zhang R K, Wang J P, Jia E N, et al. lncRNA BCAR4 sponges miR-370-3p to promote bladder cancer progression via Wnt signaling [J]. Int J Mol Med, 2020, 45(2): 578-588.
- [8] Tong M A, Wang F, Wang X. LncRNA LINC01772 promotes metastasis and EMT process in cervical cancer by sponging miR-3611 to relieve ZEB1[J]. BIOCELL, 2019, 43(3): 191-198.
- [9] Zhao G L, Zhang Y Y, Zhao Z H, et al. MiR-153 reduces stem cell-like phenotype and tumor growth of lung adenocarcinoma by targeting Jagged1[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 170-181.
- [10] 林敏华,欧宇轩,邓桂清,等. 余甘子提取物对幼鼠非酒精性脂肪肝病的防治作用[J]. 解剖学研究, 2019, 41(5): 412-417.
- [11] Zhang S, Shi YN, Gu J, et al. Mechanisms of dihydromyricetin against hepatocellular carcinoma elucidated by network pharmacology combined with experimental validation[J]. Pharm Biol, 2023, 61(1): 1108-1119.
- [12] Zhang M, Ding Y, Hu S, et al. Transcriptomics and systems network-based molecular mechanism of herbal formula Huosu-Yangwei inhibited gastric cancer in vivo[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 316: 116674.
- [13] Saini R, Sharma N, Oladeji OS, et al. Traditional uses, bioactive composition, pharmacology, and toxicology of *Phyllanthus emblica* fruits: A comprehensive review [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 282: 114570.
- [14] 于丽娟,吴丽华,王金香,等. 余甘子提取物抗氧化能力分析和对酪氨酸酶活性的影响[J]. 西南农业学报, 2020, 33(7): 1435-1440.
- [15] 马美,苏占海,王海燕. 余甘子对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响及分子机制[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2020, 41(1): 46-52.
- [16] 罗兰,林久茂,魏丽慧,等. 余甘子醇提物抑制人胃癌株 AGS 细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(8): 989-993.
- [17] Wang F, Rong L, Zhang Z K, et al. LncRNA H19-Derived miR-675-3p Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Stemness in Human Pancreatic Cancer Cells by targeting the STAT3 Pathway[J]. J Cancer, 2020, 11(16): 4771-4782.
- [18] Guo X B, Wang Y. LncRNA TMPO-AS1 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation, migration and invasion through sponging miR-329-3p to stimulate FOXK1-mediated AKT/mTOR signaling pathway[J]. Cancer Med, 2020, 9(14): 5235-5246.
- [19] Ma H Z, Wang J, Shi J, et al. LncRNA LINC00467 contributes to osteosarcoma growth and metastasis through regulating HMGA1 by directly targeting miR-217 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(11): 5933-5945.
- [20] 张德慧,严雨姮. 长链非编码 RNA LINC01772 在肝细胞肝癌中的表达及临床意义[J]. 健康必读, 2018, 1(36): 120-120.
- [21] Zhou Z, Chen J, Li M, et al. Xiaotan Sanjie Decoction Inhibits Gastric Cancer Cell Proliferation, Migration, and Invasion through lncRNA-ATB and miR-200A[J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 7029182.
- [22] Zheng Y, Su L, Tan J, et al. Actinidia chinensis Planch Root extract suppresses the growth and metastasis of hypopharyngeal carcinoma by inhibiting E2F Transcription Factor 1-mediated MNX1 antisense RNA 1[J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 4911-4922.
- [23] Shetty A, Venkatesh T, Kabbekodu SP, et al. LncRNA-miRNA-mRNA regulatory axes in endometrial cancer: a comprehensive overview[J]. Arch Gynecol Obstet, 2022, 306(5): 1431-1447.
- [24] Venkatesh J, Wasson MD, Brown JM, et al. LncRNA-miRNA axes in breast cancer: Novel points of interaction for strategic attack [J]. Cancer Lett, 2021, 509: 81-88.
- [25] Jia Z, Tang X, Zhang X, et al. miR-153-3p Attenuates the Development of Gastric Cancer by Suppressing SphK2 [J]. Biochem Genet, 2022, 60(5): 1748-1761.
- [26] Deng X, Guo B, Fan Y. MiR-153-3p Suppresses Cell Proliferation, Invasion and Glycolysis of Thyroid Cancer Through Inhibiting E3F3 Expression[J]. Onco Targets Ther, 2021, 14: 519-529.
- [27] Liu R, Chen H, Zhao P, et al. Mifepristone Derivative FZU-00,003 Suppresses Triple-negative Breast Cancer Cell Growth partially via miR-153-KLF5 axis[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(4): 611-619.