

氧化槐果碱通过调控lncRNA DUXAP8/miR-519b-3p轴 影响宫颈癌细胞增殖、凋亡、迁移 及侵袭的实验研究

姜焯 杨茹 陈杰 赵婷婷 石伟 罗莉 李功卓*

(贵航贵阳医院, 肿瘤科, 贵阳 550000)

摘要 为了探讨氧化槐果碱(OSC)对宫颈癌HeLa细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响及作用机制,本研究将HeLa细胞分为对照组(Con组)、OSC组、转染DUXAP8小干扰RNA(si-DUXAP8)组、转染小干扰RNA阴性对照(si-NC)组、OSC+DUXAP8过表达载体(pcDNA-DUXAP8)组和OSC+空载体(pcDNA)组,然后用MTT法检测细胞增殖,Transwell检测细胞迁移和侵袭,流式细胞术检测细胞凋亡,蛋白印迹法检测细胞中CyclinD1、p21、Bcl-2、Bax、MMP-2和MMP-9蛋白水平,RT-qPCR检测细胞中DUXAP8和miR-519b-3p水平;双荧光素酶报告基因实验验证DUXAP8和miR-519b-3p调控关系。结果显示,与Con组比较,OSC组HeLa细胞抑制率、凋亡率、Bax和p21蛋白水平、miR-519b-3p水平升高($P<0.05$),细胞迁移数、侵袭数、CyclinD1、Bcl-2、MMP-2和MMP-9的蛋白水平和DUXAP8水平降低($P<0.05$),且呈剂量依赖性($P<0.05$);与si-NC组比较,si-DUXAP8组HeLa细胞抑制率、凋亡率和Bax、p21蛋白水平升高($P<0.05$),细胞迁移和侵袭数及CyclinD1、Bcl-2、MMP-2、MMP-9的蛋白水平降低($P<0.05$);DUXAP8在HeLa细胞中靶向负调控miR-519b-3p表达;与OSC+pcDNA组比较,OSC+pcDNA-DUXAP8组HeLa细胞抑制率、凋亡率和Bax、p21的蛋白水平降低($P<0.05$),细胞迁移和侵袭数及CyclinD1、Bcl-2、MMP-2、MMP-9的蛋白水平升高($P<0.05$)。这提示氧化槐果可能通过调DUXAP8/miR-519b-3p轴抑制宫颈癌HeLa细胞增殖、迁移和侵袭,并诱导细胞凋亡。

关键词 氧化槐果碱; lncRNA DUXAP8; miR-519b-3p; 宫颈癌; 细胞增殖; 迁移侵袭; 凋亡

Experimental Study of Oxysophocarpine on Proliferation, Apoptosis, Migration and Invasion of Cervical Cancer Cells by Regulating LncRNA DUXAP8/miR-519b-3p Axis

JIANG Ye, YANG Ru, CHEN Jie, ZHAO Tingting, SHI Wei, LUO Li, LI Gongzhuo*

(Department of Oncology, Guiyang Hospital of Guihang, Guiyang 550000, China)

Abstract In order to explore the effects of OSC (*Oxysophocarpine*) on proliferation, apoptosis, migration and invasion of cervical cancer HeLa cells, this study divided HeLa cells into Con group (control group), OSC

收稿日期: 2020-12-14 接受日期: 2021-02-20

国家自然科学基金(批准号: 81660749)和贵阳市科技计划项目(批准号: (2019) 2-18)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13098515712, E-mail: 12752798@qq.com

Received: December 14, 2020 Accepted: February 20, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81660749) and Science and Technology Project of Guiyang City (Grant No. (2019) 2-18)

*Corresponding author. Tel: +86-13098515712, E-mail: 12752798@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5504>

group, si-DUXAP8 (DUXAP8 small interfering RNA) group, si-NC (small interfering RNA negative control) group, OSC+pcDNA-DUXAP8 (DUXAP8 overexpression vector) group and OSC+pcDNA group. Then cell proliferation was detected by MTT assay; cell migration and invasion were detected by Transwell; cell apoptosis was detected by flow cytometry; the protein levels of CyclinD1, p21, Bcl-2, Bax, MMP-2 and MMP-9 were detected by Western blot; the levels of DUXAP8 and miR-519b-3p were detected by RT-qPCR. The regulatory relationship between DUXAP8 and miR-519b-3p was verified by dual luciferase reporter gene assay. The results showed that compared with the Con group, the inhibition rate, apoptosis rate, the protein levels of Bax and p21, and the level of miR-519b-3p in the OSC groups were increased ($P<0.05$), while the number of cell migration and invasion, the protein levels of CyclinD1, Bcl-2, MMP-2 and MMP-9, and the level of DUXAP8 were decreased ($P<0.05$). Compared with the si-NC group, the inhibition rate, apoptosis rate, and the protein levels of Bax and p21 in the si-DUXAP8 group were increased ($P<0.05$), while the number of cell migration and invasion, and the protein levels of CyclinD1, Bcl-2, MMP-2 and MMP-9 were decreased ($P<0.05$). DUXAP8 negatively regulated the expression of miR-519b-3p in HeLa cells. Compared with the OSC+pcDNA group, the inhibition rate, apoptosis rate, and the protein levels of Bax and p21 in the OSC+pcDNA-DUXAP8 group were decreased ($P<0.05$), while the number of cell migration and invasion, and the protein levels of CyclinD1, Bcl-2, MMP-2 and MMP-9 were increased ($P<0.05$). This suggested that OSC could inhibit the proliferation, migration and invasion of cervical cancer HeLa cells and induce their apoptosis by regulating DUXAP8/miR-519b-3p axis.

Keywords *Oxysophocarpine*; lncRNA DUXAP8; miR-519b-3p; cervical cancer; cell proliferation; migration and invasion; apoptosis

宫颈癌发病率呈增长趋势^[1], 其治疗方法以手术为主, 并辅以放疗、化疗。但这些方法的治疗疗效具有一定的局限性, 多数患者预后较差^[2]。因此, 需要寻找治疗宫颈癌的新药物。氧化槐果碱(*Oxysophocarpine*, OSC)属于喹诺里西啶类生物碱, 在苦豆子、苦参等豆科槐属植物中广泛存在, 具有抗肿瘤、镇痛、抗炎等药理学作用^[3]。研究显示, OSC可抑制结肠癌^[4]、乳腺癌^[5]等肿瘤细胞增殖, 并诱导细胞凋亡。但目前OSC对宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭等恶性生物学行为的影响及其作用机制还未知。

长链非编码RNA(lncRNA)是一类非编码单链RNA, 参与调控基因表达, 与肿瘤的发生发展密切相关^[6]。DUXAP8属于一种lncRNA, 其参与调控胶质瘤^[7]、结直肠癌^[8]等肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移等恶性生物学行为, 是肿瘤治疗的潜在靶点。Star-Base生物信息学软件预测显示, miR-519b-3p可能是DUXAP8的靶标。但目前, DUXAP8和miR-519b-3p在宫颈癌中的作用还未知。本研究以宫颈癌HeLa细胞为研究对象, 以DUXAP8/miR-519b-3p轴为切入点, 主要观察了OSC对HeLa细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响及可能机制, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

HeLa细胞系购自中国科学院上海细胞库; 氧化槐果碱(纯度98%, 批号20181216)购自宝鸡市辰光生物科技有限公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI 1640培养基、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒和双荧光素酶活性检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 四甲基唑啉蓝(MTT)购自美国Sigma公司; Trizol试剂和Lipofectamine™ 2000试剂盒购自美国Invitrogen公司; PCR引物、miR-519b-3p模拟物(mimics)及对照序列(miR-NC)、DUXAP8小干扰RNA(si-DUXAP8)及乱序无意义阴性序列(si-NC)、DUXAP8野生型质粒(WT-DUXAP8)、突变型质粒(MUT-DUXAP8)、DUXAP8过表达载体(pcDNA-DUXAP8)及空载体(pcDNA)购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司; 逆转录试剂盒和PCR试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; 鼠抗人细胞周期蛋白D1(CyclinD1)、p21单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; 兔抗人基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、B淋巴细胞瘤-2相关蛋白(Bax)

多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒购自上海美吉生物医药科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 用含10% FBS的RPMI 1640培养基培养HeLa细胞。调整HeLa细胞浓度为 2.5×10^4 个/mL,以每孔2.5 mL接种于6孔板中。采用Lipofectamine™ 2000脂质体法,将si-DUXAP8、si-NC、pcDNA-DUXAP8和pcDNA分别转染至HeLa细胞。转染12 h后,收集细胞用于后续实验。

1.2.2 细胞分组 未转染的HeLa细胞分为对照组(Con组)和OSC组,其中OSC组细胞分别用含0.5、1、2 mg/mL¹⁴OSC的培养基干预24 h; Con组细胞用不含OSC的培养基干预24 h。转染si-DUXAP8、si-NC的HeLa细胞均用不含OSC的培养基干预24 h,分别记为si-DUXAP8组、si-NC组。转染pcDNA-DUXAP8、pcDNA的HeLa细胞均用含2 mg/mL OSC的培养基干预24 h,并分别记为OSC+pcDNA-DUXAP8组、OSC+pcDNA组。

1.2.3 MTT检测细胞增殖 调整未转染、转染的细胞浓度均为 5.0×10^4 个/mL,以200 μ L/孔接种于96孔板中。培养4 h后,弃培养基,按照1.2.2处理,处理结束后。向每孔中加20 μ L MTT(5 mg/mL),孵育4 h后,弃培养基,加150 μ L二甲基亚砷,振荡均匀,酶标仪于490 nm处测吸光度(D)值。细胞抑制率(%)=($D_{\text{对照组}} - D_{\text{实验组}}$)/ $D_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 调整未转染、转染的细胞浓度为 5.0×10^4 个/mL,以1.0 mL/孔接种于24孔板中。培养4 h后,弃培养基,按照1.2.2处理。处理结束后,用0.25%胰蛋白酶消化,收集细胞。利用Annexin V-FITC/PI试剂盒,采用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.5 Transwell检测细胞迁移和侵袭 调整未转染、转染的细胞浓度为 5.0×10^4 个/mL。迁移实验:Transwell上室加100 μ L细胞悬液,下室加500 μ L培养基。培养4 h后,弃培养基,按照1.2.2处理。处理结束后,弃培养基,经4%多聚甲醛固定30 min、0.4%结晶紫染色15 min后,显微镜下观察,随机取5个视野,对迁移细胞计数。侵袭实验:预先将Matrigel基质胶铺于Transwell上室,自然晾干后,再加100 μ L细胞悬液,后续操作同迁移实验。

1.2.6 RT-qPCR检测细胞中DUXAP8和miR-519b-3p水平 调整未转染、转染的细胞浓度为 5.0×10^4 个/mL,

以1.0 mL/孔接种于24孔板中。培养4 h后,弃培养基,按照1.2.2处理。处理结束后,用Trizol试剂提取细胞中总RNA,逆转录为cDNA。以cDNA为模板,进行PCR扩增。引物序列: DUXAP8上游5'-AGG ATG GAG TCT CGC TGT ATT GC-3',下游5'-GGA GGT TTG TTT TCT TCT TTT TT-3'; GAPDH上游5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3',下游5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'; miR-519b-3p上游5'-AAA GTG CAT CCT TTT AGA GG-3',下游5'-TTG GAT GCC CGT GAC CAA GT-3'; U6上游5'-CAC CAC GTT TAT ACG CCG GTG-3',下游5'-GGT CCC AAG TAA ACG ACA GTG CAG-3'。2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算DUXAP8和miR-519b-3p的相对表达水平,其中DUXAP8以GAPDH为内参,miR-519b-3p以U6为内参。

1.2.7 蛋白印迹法检测增殖、凋亡、迁移和侵袭相关蛋白表达 调整未转染、转染的细胞浓度为 5.0×10^4 个/mL,以1.0 mL/孔接种于24孔板中。培养4 h后,弃培养基,按照1.2.2处理。处理结束后,用RIPA试剂提取细胞中总蛋白,经BCA法测定蛋白含量后,行10% SDS-PAGE电泳。将分离蛋白转至PVDF膜,5%脱脂奶粉中37 $^{\circ}$ C封闭1 h。分别加CyclinD1(1:400)、p21(1:600)、Bcl-2(1:400)、Bax(1:400)、MMP-2(1:500)、MMP-9(1:500)一抗,4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。加山羊抗兔二抗IgG(1:2 000),室温孵育1 h。滴加化学发光试剂,避光显影后,曝光拍照。

1.2.8 双荧光素酶报告基因实验 调整各组细胞浓度为 2.5×10^4 个/mL,以1.0 mL/孔接种于24孔板中,利用Lipofectamine™ 2000脂质体法,分别共转染WT-DUXAP8与miR-519b-3p mimic、WT-DUXAP8与miR-NC、MUT-DUXAP8与miR-519b-3p mimic、MUT-DUXAP8与miR-NC。转染12 h后,收集细胞。用PBS清洗2次,加细胞裂解液充分裂解细胞,离心(3 500 r/min、5 min)。取10 μ L上清,加50 μ L Luciferase Assay Reagent II,混匀后,用荧光发光仪检测萤火虫荧光素酶活性值;然后再加50 μ L Stop & Glo® Reagent,再次用荧光发光仪检测海肾荧光素酶活性值,每组细胞的荧光素酶活性结果以萤火虫荧光素酶活性值与海肾荧光素酶活性值的比值表示。

1.3 统计学分析

利用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,且均符合正态分布。两组间比较用独立样本t检验;多组间比较用单因素方差

分析, 进一步两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氧化槐果碱抑制宫颈癌HeLa细胞增殖

MTT法和蛋白印迹法分别检测HeLa细胞经0.5、1、2 mg/mL OSC干预后细胞增殖抑制率及增殖相关蛋白CyclinD1和p21的表达。结果显示, 与Con组比较, OSC组HeLa细胞抑制率和p21蛋白水平升高($P<0.05$), CyclinD1蛋白水平降低($P<0.05$), 且不同浓度OSC组间比较差异显著($P<0.05$)(图1和表1)。

2.2 氧化槐果碱抑制宫颈癌HeLa细胞迁移和侵袭

Transwell法和蛋白印迹法分别检测HeLa细胞经0.5、1、2 mg/mL OSC干预后细胞迁移、侵袭及相关蛋白MMP-2和MMP-9的表达。结果显示, 与Con组比较, OSC组HeLa细胞迁移和侵袭个数及MMP-2和MMP-9蛋白水平降低($P<0.05$), 且不同浓度OSC组间比较差异显著($P<0.05$)(图2和表2)。

2.3 氧化槐果碱促进宫颈癌HeLa细胞凋亡

流式细胞术和蛋白印迹法分别检测HeLa细胞经0.5、1、2 mg/mL OSC干预后细胞凋亡及凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax的表达。结果显示, 与Con组

比较, OSC组HeLa细胞凋亡率和Bax蛋白水平升高($P<0.05$), Bcl-2蛋白水平降低($P<0.05$), 且不同浓度OSC组间比较差异显著($P<0.05$)(图3和表3)。

2.4 氧化槐果碱对宫颈癌HeLa细胞中DUXAP8和miR-519b-3p表达的影响

RT-qPCR检测HeLa细胞经0.5、1、2 mg/mL OSC干预后细胞中DUXAP8和miR-519b-3p表达。结果显示, 与Con组比较, OSC组HeLa细胞中DUXAP8水平降低($P<0.05$), miR-519b-3p水平升高($P<0.05$), 且不同浓度OSC组间比较差异显著($P<0.05$)(表4)。

2.5 DUXAP8靶向调控miR-519b-3p的表达

通过StarBase对DUXAP8和miR-519b-3p结合进行预测, DUXAP8和miR-519b-3p之间存在连续结合位点(图4)。双荧光素酶报告基因实验结果显示, 与共转染WT-DUXAP8与miR-NC的细胞比较, 共转染WT-DUXAP8与miR-519b-3p mimics的细胞荧光素酶活性降低($P<0.05$); 而与共转染MUT-DUXAP8与miR-NC的细胞比较, 共转染MUT-DUXAP8与miR-519b-3p mimics的细胞荧光素酶活性无显著变化($P>0.05$)(表5)。RT-qPCR检测过表达DUXAP8或干扰DUXAP8对HeLa细胞中miR-519b-3p表达的影响, 结果显示, pcDNA-DUXAP8组miR-519b-3p水平低于pcDNA

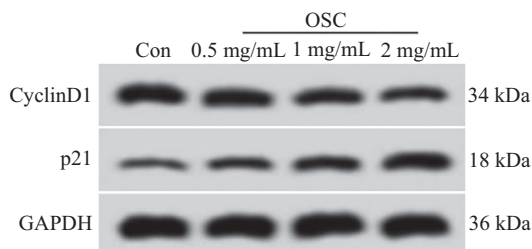


图1 OSC对HeLa细胞中CyclinD1和p21蛋白表达的影响

Fig.1 The effect of OSC on the protein expression of CyclinD1 and p21 in HeLa cells

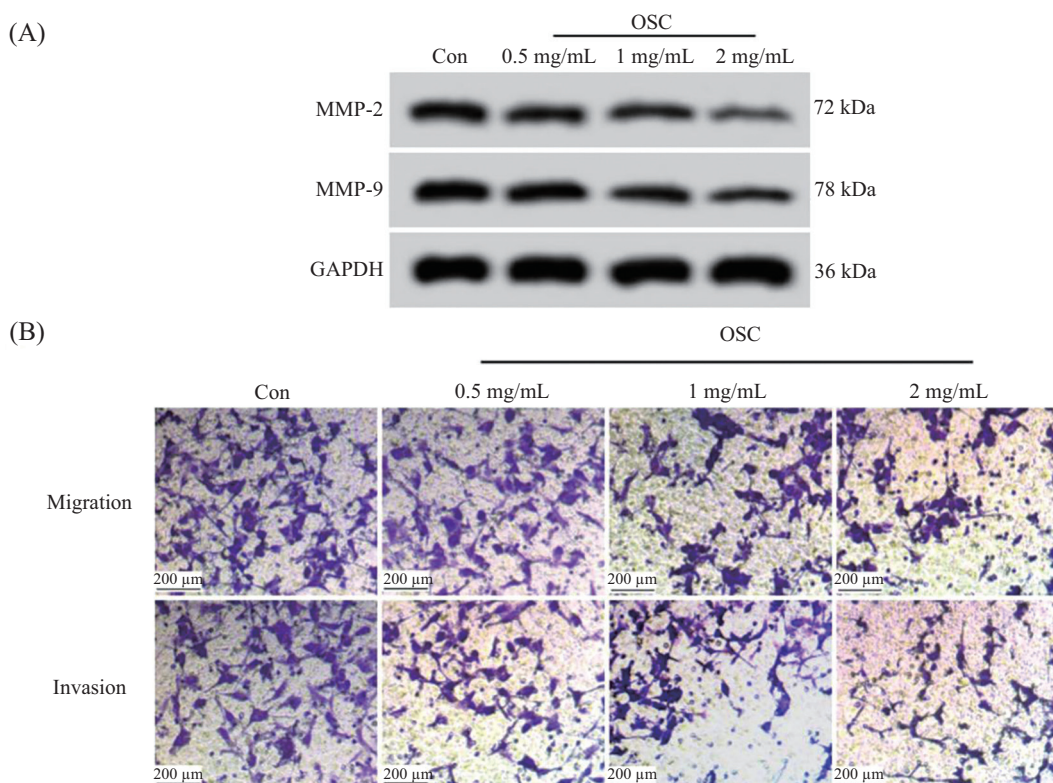
表1 OSC对HeLa细胞抑制率及CyclinD1和p21蛋白表达的影响

Table 1 The effects of OSC on the inhibition rate of HeLa cells and the protein expression of CyclinD1 and p21

分组 Groups	抑制率/% Inhibition rate /%	CyclinD1蛋白 CyclinD1 protein	p21蛋白 p21 protein
Con	0.00±0.01	0.81±0.07	0.22±0.03
OSC 0.5 mg/mL	8.14±0.85 ^a	0.69±0.06 ^a	0.35±0.03 ^a
OSC 1 mg/mL	21.65±2.45 ^{ab}	0.55±0.05 ^{ab}	0.47±0.04 ^{ab}
OSC 2 mg/mL	42.66±4.32 ^{abc}	0.41±0.04 ^{abc}	0.62±0.05 ^{abc}
<i>F</i>	492.514	85.619	177.559
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$, 与Con组比较; ^b $P<0.05$, 与OSC 0.5 mg/mL组比较; ^c $P<0.05$, 与OSC 1 mg/mL组比较。

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$ compared with the Con group; ^b $P<0.05$ compared with the 0.5 mg/mL OSC group; ^c $P<0.05$ compared with the 1 mg/mL OSC group.



A: OSC干预HeLa细胞后细胞中MMP-2、MMP-9 蛋白表达; B: OSC干预HeLa细胞后细胞迁移和侵袭。

A: the protein expression of MMP-2 and MMP-9 in HeLa cells interfered by OSC; B: the migration and invasion of HeLa cells interfered by OSC.

图2 OSC对HeLa细胞迁移和侵袭的影响

Fig.2 The effect of OSC on the migration and invasion of HeLa cells

表2 OSC对HeLa细胞迁移和侵袭及MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响

Table 2 The effects of OSC on the migration and invasion of HeLa cells and the protein expression of MMP-2 and MMP-9

分组 Groups	迁移细胞数量 Migration cell number	侵袭细胞数量 Invasive cell number	MMP-2蛋白 MMP-2 protein	MMP-9蛋白 MMP-9 protein
Con	105.32±10.11	89.65±8.67	0.69±0.06	0.77±0.07
OSC 0.5 mg/mL	81.65±8.32 ^a	72.45±7.29 ^a	0.56±0.05 ^a	0.64±0.05 ^a
OSC 1 mg/mL	68.46±6.55 ^{ab}	61.87±6.83 ^{ab}	0.43±0.04 ^{ab}	0.51±0.04 ^{ab}
OSC 2 mg/mL	51.65±5.38 ^{abc}	42.65±4.11 ^{abc}	0.31±0.03 ^{abc}	0.36±0.03 ^{abc}
<i>F</i>	75.911	72.648	112.569	112.242
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$, 与Con组比较; ^b $P<0.05$, 与OSC 0.5 mg/mL组比较; ^c $P<0.05$, 与OSC 1 mg/mL组比较。

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$ compared with the Con group; ^b $P<0.05$ compared with the 0.5 mg/mL OSC group; ^c $P<0.05$ compared with the 1 mg/mL OSC group.

组 (0.43 ± 0.04 比 1.00 ± 0.08 , $t=19.118$, $P<0.05$), 而 si-DUXAP8组 miR-519b-3p水平高于 si-NC组 (2.41 ± 0.24 比 0.99 ± 0.09 , $t=16.620$, $P<0.05$)。说明 DUXAP8在 HeLa细胞中靶向负调控miR-519b-3p表达。

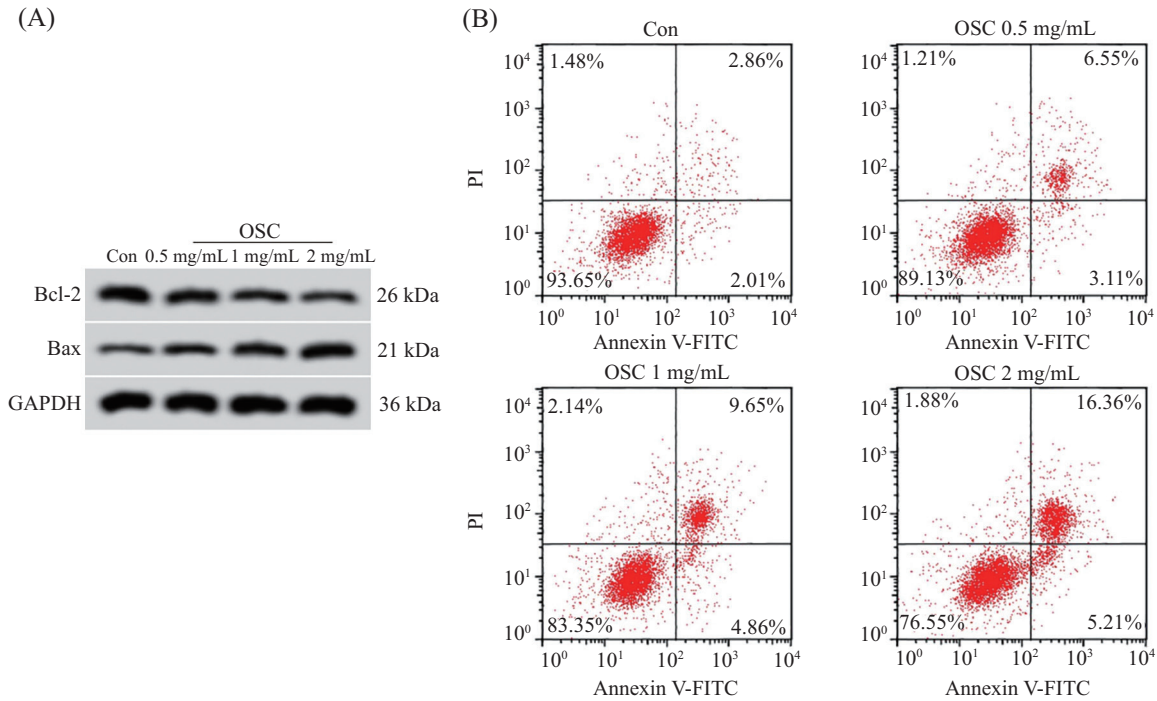
2.6 干扰DUXAP8表达对宫颈癌HeLa细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

MTT法、Transwell、流式细胞术及蛋白印迹法分别检测干扰DUXAP8后HeLa细胞增殖、迁移、侵袭

和凋亡及相关蛋白表达。结果显示, 与si-NC组比较, si-DUXAP8组 miR-519b-3p水平、HeLa细胞抑制率、凋亡率以及Bax、p21蛋白水平升高 ($P<0.05$), DUXAP8水平、迁移和侵袭细胞数及CyclinD1、Bcl-2、MMP-2和MMP-9蛋白水平降低 ($P<0.05$) (图5、图6、表6和表7)。

2.7 过表达DUXAP8减弱氧化槐果碱对宫颈癌HeLa细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

MTT法、Transwell、流式细胞术及蛋白印



A: OSC干预HeLa细胞后细胞中Bcl-2、Bax蛋白表达; B: OSC干预HeLa细胞后细胞凋亡流式图。
A: the protein expression of Bcl-2 and Bax in HeLa cells interfered by OSC; B: Flow cytometry of HeLa cells interfered by OSC.

图3 OSC对HeLa细胞凋亡的影响
Fig.3 The effect of OSC on the apoptosis of HeLa cells

表3 OSC对HeLa细胞凋亡及Bcl-2、Bax蛋白表达的影响
Table 3 The effects of OSC on the apoptosis of HeLa cells and the protein expression of Bcl-2 and Bax

分组 Groups	细胞凋亡率/% Apoptosis rate /%	Bcl-2 蛋白 Bcl-2 protein	Bax蛋白 Bax protein
Con	6.35±0.64	0.72±0.07	0.28±0.03
OSC 0.5 mg/mL	10.87±0.96 ^a	0.59±0.05 ^a	0.41±0.04 ^a
OSC 1 mg/mL	16.65±1.48 ^{ab}	0.46±0.04 ^{ab}	0.54±0.04 ^{ab}
OSC 2 mg/mL	23.45±2.01 ^{abc}	0.33±0.03 ^{abc}	0.66±0.05 ^{abc}
<i>F</i>	260.590	102.424	146.681
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$, 与Con组比较; ^b $P<0.05$, 与OSC 0.5 mg/mL组比较; ^c $P<0.05$, 与OSC 1 mg/mL组比较。
 $\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$ compared with the Con group; ^b $P<0.05$ compared with the 0.5 mg/mL OSC group; ^c $P<0.05$ compared with the 1 mg/mL OSC group.

表4 OSC对HeLa细胞中DUXAP8和miR-519b-3p表达的影响
Table 4 The effect of OSC on the expression of DUXAP8 and miR-519b-3p in HeLa cells

分组 Groups	DUXAP8	miR-519b-3p
Con	1.00±0.08	1.00±0.09
OSC 0.5 mg/mL	0.78±0.07 ^a	1.36±0.13 ^a
OSC 1 mg/mL	0.64±0.06 ^{ab}	1.74±0.17 ^{ab}
OSC 2 mg/mL	0.49±0.05 ^{abc}	2.35±0.23 ^{abc}
<i>F</i>	97.293	112.255
<i>P</i>	<0.001	<0.001

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$, 与Con组比较; ^b $P<0.05$, 与OSC 0.5 mg/mL组比较; ^c $P<0.05$, 与OSC 1 mg/mL组比较。
 $\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$ compared with the Con group; ^b $P<0.05$ compared with the 0.5 mg/mL OSC group; ^c $P<0.05$ compared with the 1 mg/mL OSC group.

迹法分别检测 2 mg/mL OSC 对过表达 DUXAP8 的 HeLa 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡及相关蛋白表达的影响。结果显示,与 OSC+pcDNA 组比较, OSC+pcDNA-DUXAP8 组 miR-519b-3p 水平、HeLa

细胞抑制率、凋亡率和 Bax、p21 蛋白水平降低 ($P<0.05$), DUXAP8 水平、迁移和侵袭细胞数及 CyclinD1、Bcl-2、MMP-2、MMP-9 蛋白水平升高 ($P<0.05$) (图7、图8、表8和表9)。

```

WT-DUXAP8 5' uuggaCUAUAAAUAUGCACUUC 3'
miR-519b-3p 3' uuggaGAUUUCCUACGUGAAa 5'
MUT-DUXAP8 5' uuggaAGCUCUAUCAUACUAGc 3'
  
```

图4 DUXAP8与miR-519b-3p互补的核苷酸序列

Fig.4 The complementary nucleotide sequences between DUXAP8 and miR-519b-3p

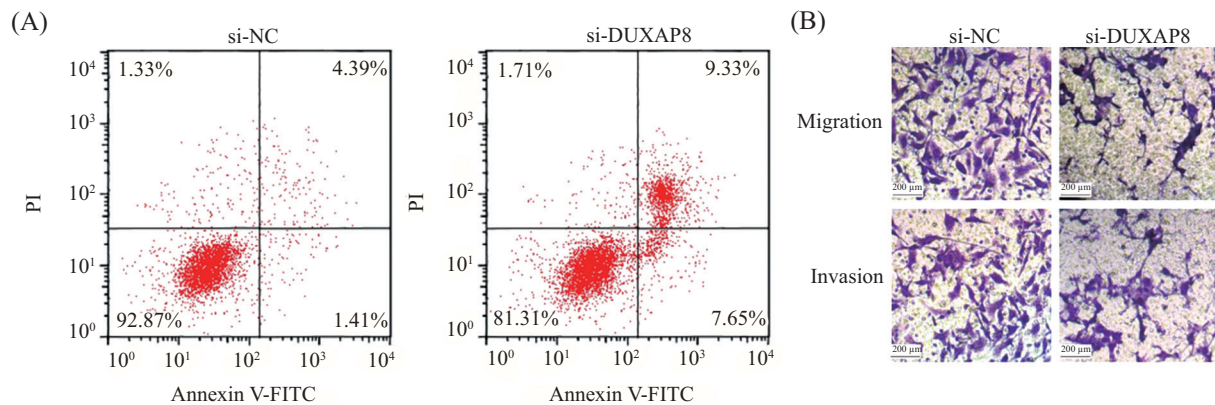
表5 各组细胞荧光素酶活性检测结果

Table 5 Test results of luciferase activity in each group of cells

分组 Groups	WT-DUXAP8	MUT-DUXAP8
miR-NC	1.00±0.09	0.99±0.09
miR-519b-3p	0.35±0.04 ^a	1.01±0.08
<i>t</i>	19.799	0.498
<i>P</i>	<0.001	0.625

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$, 与miR-NC组比较。

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$ compared with the miR-NC group.



A: 干扰DUXAP8后HeLa细胞凋亡流式图; B: 干扰DUXAP8后HeLa细胞迁移和侵袭。

A: Flow cytometric diagram of HeLa cells interfered with DUXAP8; B: the migration and invasion of HeLa cells interfered with DUXAP8.

图5 干扰DUXAP8对HeLa细胞凋亡、迁移和侵袭的影响

Fig.5 The effects of interfering with DUXAP8 on the apoptosis, migration and invasion of HeLa cells

表6 干扰DUXAP8对HeLa细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

Table 6 The effect of interfering with DUXAP8 on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of HeLa cells

分组 Groups	DUXAP8	miR-519b-3p	迁移细胞数量 Migration cell number	侵袭细胞数量 Invasive cell number	抑制率/% Inhibition rate /%	细胞凋亡率/% Apoptosis rate /%
si-NC	1.00±0.09	1.01±0.08	108.98±9.68	86.35±8.94	5.36±0.54	7.13±0.71
si-DUXAP8	0.48±0.04 ^a	2.46±0.25 ^a	59.34±5.87 ^a	51.33±5.48 ^a	31.25±3.17 ^a	18.69±1.85 ^a
<i>t</i>	15.839	16.572	13.154	10.019	24.153	17.501
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$,与si-NC组比较。

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$ compared with the si-NC group.

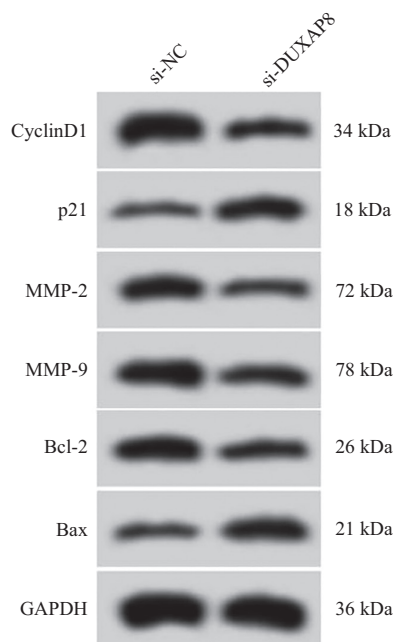


图6 干扰DUXAP8后HeLa细胞中CyclinD1、p21、MMP-2、MMP-9、Bcl-2和Bax蛋白表达

Fig.6 The protein expression of CyclinD1, p21, MMP-2, MMP-9, Bcl-2 and Bax in HeLa cells interfered with DUXAP8

表7 干扰DUXAP8对HeLa细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭及相关蛋白表达的影响

Table 7 The effects of interfering DUXAP8 on HeLa cells proliferation, apoptosis, migration and invasion and related protein expression

分组 Groups	CyclinD1蛋白 CyclinD1 protein	p21蛋白 p21 protein	MMP-2蛋白 MMP-2 protein	MMP-9蛋白 MMP-9 protein	Bcl-2蛋白 Bcl-2 protein	Bax蛋白 Bax protein
si-NC	0.83±0.08	0.21±0.03	0.68±0.07	0.79±0.07	0.73±0.07	0.27±0.03
si-DUXAP8	0.44±0.04 ^a	0.58±0.05 ^a	0.36±0.03 ^a	0.41±0.04 ^a	0.39±0.04 ^a	0.62±0.06 ^a
<i>t</i>	13.081	19.036	12.605	14.140	12.651	15.652
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$, 与si-NC组比较。

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$ compared with the si-NC group.

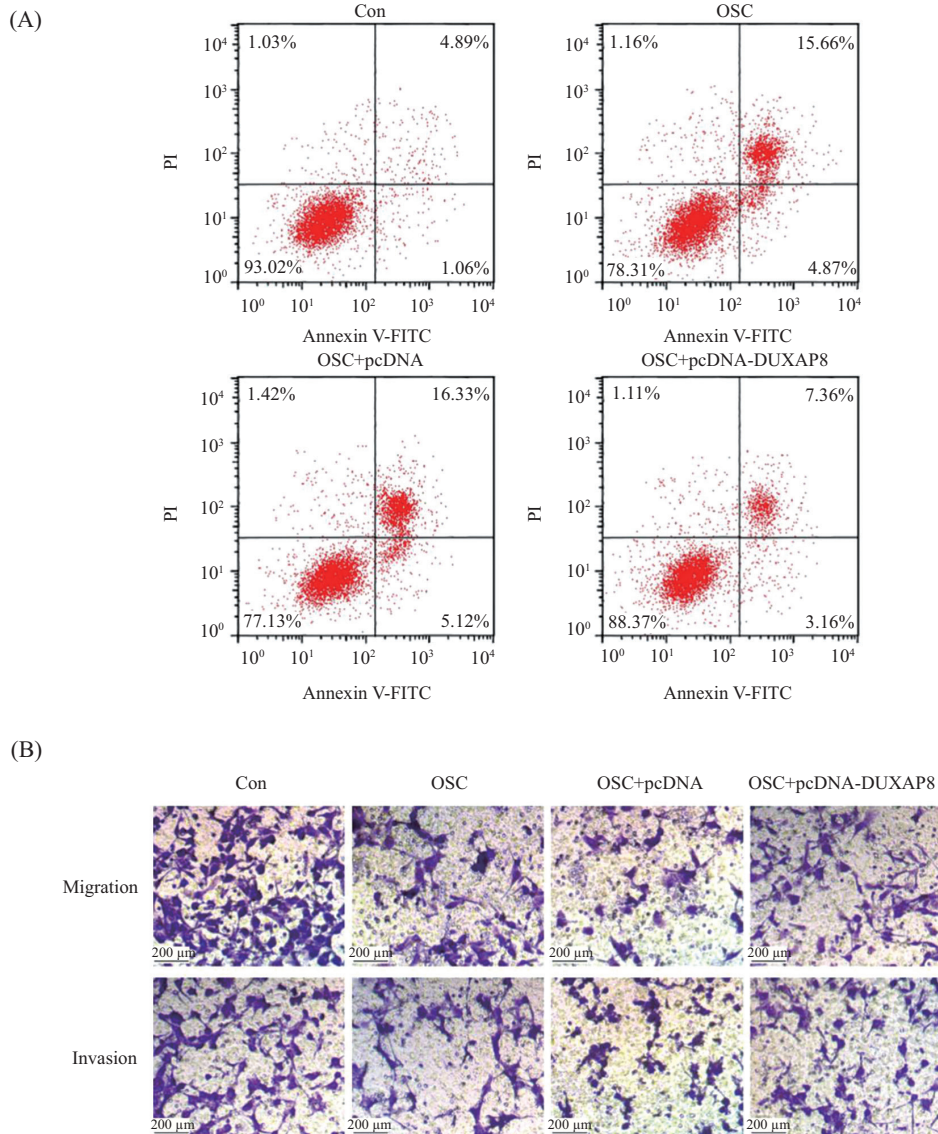
3 讨论

OSC是苦豆子、苦参等豆科槐属植物的主要成分,具有多种生物活性。吴璟等^[9]研究显示,OSC可能通过抑制肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6、前列腺素等炎症因子的表达减轻对角叉菜胶诱导的小鼠疼痛。近年来,OSC的抗肿瘤作用受到关注。张绪慧等^[10]研究显示,OSC可降低结直肠癌SW480细胞的增殖能力,阻滞SW480细胞周期进程,并促进细胞凋亡,具有一定抗结直肠癌作用。本研究显示,OSC可抑制宫颈癌HeLa细胞增殖、迁移和侵袭,并诱导细胞凋亡,且呈剂量依赖性,提示OSC可能是宫颈癌治疗的潜在药物。

细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡受多种基因分子的调控。p21是目前已知的肿瘤抑制因子,其表达

增加可降低肿瘤细胞的增殖能力^[11]; CyclinD1是细胞周期调控蛋白,其表达增加促进细胞周期进程,加速细胞增殖^[12]; Bax/Bcl-2参与调控细胞凋亡,其Bax促进细胞凋亡,而Bcl-2对细胞凋亡起抑制作用^[13]; MMP-2和MMP-9属于基质金属蛋白酶家族成员,参与降解细胞外基质,促进细胞迁移和侵袭^[14]。本研究显示,OSC促进HeLa细胞中p21和Bax蛋白表达,而抑制CyclinD1、Bcl-2、MMP-2和MMP-9蛋白表达,进一步从这些与细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡相关蛋白表达的变化说明了OSC可影响宫颈癌细胞的恶性表型。

为了进一步探讨OSC发挥抗宫颈癌作用的机制,本研究检测了OSC对HeLa细胞DUXAP8表达水平的影响,结果显示,OSC干预HeLa细胞后,细胞中



A: OSC对过表达DUXAP8的HeLa细胞凋亡的影响; B: OSC对过表达DUXAP8的HeLa细胞迁移和侵袭的影响。

A: the effect of OSC on the apoptosis of HeLa cells overexpressing DUXAP8; B: the effects of OSC on the migration and invasion of HeLa cells overexpressing DUXAP8.

图7 过表达DUXAP8减弱OSC对HeLa细胞凋亡、迁移和侵袭的影响

Fig.7 Overexpression of DUXAP8 attenuates the effects of OSC on the apoptosis, migration and invasion of HeLa cells

表8 过表达DUXAP8减弱OSC对HeLa细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

Table 8 Overexpression of DUXAP8 attenuates the effects of OSC on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of HeLa cells

分组 Groups	DUXAP8	miR-519b-3p	迁移细胞数量 Migration cell number	侵袭细胞数量 Invasive cell number	抑制率/% Inhibition rate /%	细胞凋亡率/% Apoptosis rate /%
Con	1.01±0.09	1.00±0.07	107.32±9.22	87.65±8.35	0.00±0.01	6.98±0.69
OSC	0.47±0.04 ^a	2.31±0.23 ^a	53.15±5.46 ^a	45.16±4.87 ^a	41.69±4.28 ^a	21.69±2.34 ^a
OSC+pcDNA	0.45±0.04	2.33±0.22	52.98±5.39	43.87±4.81	43.65±4.33	22.87±2.25
OSC+pcDNA-DUXAP8	0.83±0.07 ^b	1.46±0.15 ^b	87.45±8.33 ^b	71.36±7.32 ^b	19.65±1.87 ^b	11.63±1.17 ^b
<i>F</i>	168.888	120.662	121.636	95.594	376.816	174.293
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$, 与Con组比较; ^b $P<0.05$, 与OSC+pcDNA组比较。

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$ compared with the Con group; ^b $P<0.05$ compared with the OSC+pcDNA group.

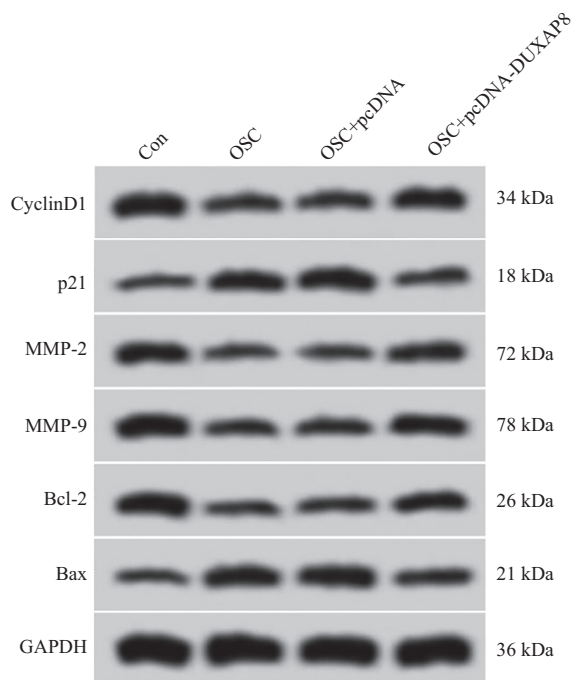


图8 OSC对过表达DUXAP8的HeLa细胞中CyclinD1、p21、MMP-2、MMP-9、Bcl-2和Bax蛋白表达的影响
Fig.8 The effect of OSC on the protein expression of CyclinD1, p21, MMP-2, MMP-9, Bcl-2 and Bax in HeLa cells overexpressing DUXAP8

表9 过表达DUXAP8减弱OSC对HeLa细胞中CyclinD1、p21、MMP-2、MMP-9、Bcl-2和Bax蛋白表达的影响
Table 9 Overexpression of DUXAP8 attenuates the effect of OSC on the protein expression of CyclinD1, p21, MMP-2, MMP-9, Bcl-2 and Bax in HeLa cells

分组 Groups	CyclinD1蛋白 CyclinD1 protein	p21蛋白 p21 protein	MMP-2蛋白 MMP-2 protein	MMP-9蛋白 MMP-9 protein	Bcl-2蛋白 Bcl-2 protein	Bax蛋白 Bax protein
Con	0.82±0.08	0.23±0.03	0.67±0.07	0.78±0.07	0.74±0.07	0.26±0.03
OSC	0.43±0.04 ^a	0.61±0.06 ^a	0.30±0.03 ^a	0.37±0.03 ^a	0.32±0.03 ^a	0.68±0.06 ^a
OSC+pcDNA	0.42±0.04	0.62±0.05	0.29±0.03	0.35±0.04	0.31±0.03	0.69±0.05
OSC+pcDNA-DUXAP8	0.71±0.07 ^b	0.34±0.03 ^b	0.56±0.05 ^b	0.67±0.06 ^b	0.62±0.06 ^b	0.38±0.04 ^b
<i>F</i>	100.717	174.683	141.521	152.154	163.660	196.011
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$, 与Con组比较; ^b $P<0.05$, 与OSC+pcDNA组比较。

$\bar{x}\pm s$; $n=9$; ^a $P<0.05$ compared with the Con group; ^b $P<0.05$ compared with the OSC+pcDNA group.

DUXAP8水平降低,提示DUXAP8可能参与宫颈癌的发生发展。研究显示,DUXAP8高表达的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者预后不佳,下调DUXAP8可明显降低NSCLC细胞的生长、迁移和侵袭能力,同时诱导细胞凋亡^[15];DUXAP8在肾细胞癌中表达上调,其通过靶向下调miR-126表达促进肾细胞癌发生发展^[16];过表达DUXAP8通过与miR-422a结合并促进PDK2表达,进而促进了肝癌细胞的增殖、转移和上皮-间质转化^[17]。但目前,还未见DUXAP8对宫颈癌细胞增殖、凋亡等生物学行为影响的相关报道。本研究显示,干扰HeLa细胞中

DUXAP8表达后,HeLa细胞增殖、迁移和侵袭能力降低,凋亡加剧,说明提示DUXAP8可能是宫颈癌治疗的分子靶点。本研究还显示,OSC作用于过表达DUXAP8的HeLa细胞后,细胞的增殖、迁移和侵袭能力强于正常表达DUXAP8的HeLa细胞,而凋亡程度低于正常表达DUXAP8的HeLa细胞,进一步说明OSC通过下调DUXAP8表达发挥抗宫颈癌作用。

StarBase生物学软件预测显示,miR-519b-3p可能是DUXAP8的靶标。miR-519b-3p是一种微小RNA(miRNA),参与多种肿瘤的发展进程。研究显示,喉癌组织中miR-519b-3p呈低表达,过表达miR-

519b-3p可抑制环氧化酶-2的表达阻滞喉癌细胞周期进程,抑制喉癌细胞生长^[18];大肠癌组织和细胞系中miR-519b-3p的表达明显降低,上调miR-519b-3p表达后,大肠癌细胞RKO和DLD-1的增殖和侵袭能力减弱^[19];敲低LINC01419可靶向上调miR-519b-3p抑制肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭^[20]。但目前,miR-519b-3p在宫颈癌中的作用还未知。本研究通过双荧光素酶报告基因实验和qRT-PCR实验证实了DUXAP8在宫颈癌HeLa细胞中靶向负调控miR-519b-3p表达,这一结果也与OSC作用HeLa细胞后,细胞中DUXAP8水平降低,而miR-519b-3p水平升高一致。上述这些结果表明,OSC可能通过调控DUXAP8/miR-519b-3p轴抑制宫颈癌的发生发展,是宫颈癌治疗的潜在药物。

综上所述,OSC对宫颈癌HeLa细胞的增殖、迁移和侵袭具有一定抑制作用,且能够促进HeLa细胞凋亡,其作用机制与靶向抑制DUXAP8并上调miR-519b-3p的表达有关,具有研发为宫颈癌治疗药物的潜在价值。但是,本研究仅通过体外细胞实验进行了初步分析,接下来将通过动物实验进一步在体内验证OSC对宫颈癌发生发展中的影响及其他可能的调控途径,以期为OSC用于宫颈癌的临床治疗提供实验依据。

参考文献 (References)

- [1] LI X T, ZHENG R S, LI X M, et al. Trends of incidence rate and age at diagnosis for cervical cancer in China, from 2000 to 2014 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2017, 29(6): 477-86.
- [2] 文雪梅, 陈瑛, 李婷, 等. 白花蛇舌草对宫颈癌细胞增殖、凋亡及Ki-67表达的影响[J]. *中国老年学杂志*(WEN X M, CHEN Y, LI T, et al. Effect of *Oldenlandia diffusa* on the proliferation, apoptosis and Ki-67 expression of cervical cancer cells [J]. *Chin J Gerontol*), 2017, 37(3): 561-3.
- [3] LU Y, LOU J, LIU X, et al. Oxysophocarpine reduces oxygen-glucose deprivation-induced microglial activation and injury [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(5): 2266-75.
- [4] 张绪慧, 梁磊, 蔡长青, 等. 氧化槐果碱对人结肠腺癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. *广东医学*(ZHANG X H, LIANG L, CAI C Q, et al. Effects of *oxysophocarpine* on proliferation and apoptosis of human colon cancer cells [J]. *Guangdong Med J*), 2015, 36(5): 660-4.
- [5] 资源, 赵文键, 程庆, 等. 氧化槐果碱对人乳腺癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. *中国临床药理学杂志*(ZI Y, ZHAO W J, CHENG Q, et al. Effect of *oxysophocarpine* on proliferation and apoptosis of human breast cancer cell [J]. *Chin J Clin Pharmacol*), 2016, 32(2): 174-7.
- [6] ZUO Z K, GONG Y, CHEN X H, et al. TGF β 1-induced LncRNA UCA1 upregulation promotes gastric cancer invasion and migration [J]. *Dna Cell Biol*, 2017, 36(2): 159-67.
- [7] ZHAO X, HAO S, WANG M Q, et al. Knockdown of pseudo-gene DUXAP8 expression in glioma suppresses tumor cell proliferation [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(3): 3511-6.
- [8] DU C, WANG H X, CHEN P, et al. STAT3-induced upregulation of lncRNA DUXAP8 functions as ceRNA for miR-577 to promote the migration and invasion in colorectal cancer through the regulation of RAB14 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(14): 6105-18.
- [9] 吴璟, 杨文, 郑婕, 等. 氧化槐果碱对小鼠炎症性疼痛的镇痛作用研究[J]. *中国比较医学杂志*(WU J, YANG W, ZHENG J, et al. *Oxysophocarpine* ameliorates carrageenan-induced inflammatory pain via inhibiting expressions of prostaglandin E2 and cytokines in mice [J]. *Chin J Compara Med*), 2017, 27(1): 54-8.
- [10] 张绪慧, 梁磊, 蔡长青. 氧化槐果碱诱导SW480细胞凋亡的实验研究[J]. *中国临床药理学杂志*(ZHANG X H, LIANG L, CAI C Q. Oxygen experimental study on the effects of *oxysophocarpine* inducing the apoptosis of cell lines SW480 [J]. *Chin J Clin Pharmacol*), 2014, 30(8): 712-4.
- [11] YUE K, MA J L, JIANG T, et al. LncRNA RPPH1 predicts poor prognosis and regulates cell proliferation and migration by repressing P21 expression in gastric cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(21): 11072-80.
- [12] WANG J B, QUAN Y, LV J, et al. LncRNA IDH1-AS1 suppresses cell proliferation and tumor growth in glioma [J]. *Biochem Cell Biol*, 2020, 98(5): 556-64.
- [13] ZHANG X J, QI G T, ZHANG X M, et al. LncRNA RHPN1-AS1 promotes the progression of endometrial cancer through the activation of ERK/MAPK pathway [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2021, 47(2): 533-43.
- [14] ZHU L M, LI N. Downregulation of long noncoding RNA TUSC7 promoted cell growth, invasion and migration through sponging with miR-616-5p/GSK3 β pathway in ovarian cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(13): 7253-65.
- [15] SUN M, NIE F Q, ZANG C, et al. The pseudogene DUXAP8 promotes non-small-cell lung cancer cell proliferation and invasion by epigenetically silencing EGR1 and RHOB [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(3): 739-51.
- [16] HUANG T, WANG X, YANG X K, et al. Long non-coding RNA DUXAP8 enhances renal cell carcinoma progression via down-regulating miR-126 [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 7340-7.
- [17] WEI F F, YANG L, JIANG D D, et al. Long noncoding RNA DUXAP8 contributes to the progression of hepatocellular carcinoma via regulating miR-422a/PDK2 axis [J]. *Cancer Med*, 2020, 9(7): 2480-90.
- [18] 沈志森, 詹国文, 邓红霞, 等. 微小RNA-519b-3p对人喉癌Hep-2细胞增殖的抑制作用及其机制[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*(SHEN Z S, ZHAN G W, DENG H X, et al. Growth inhibitory effect of microRNA-519b-3p on larynx squamous Hep-2 cells [J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*), 2014, 49(2): 151-6.
- [19] ZHANG Y X, SUN M, CHEN Y S, et al. MiR-519b-3p inhibits the proliferation and invasion in colorectal cancer modulating the umtck/wnt signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 741-58.
- [20] CHENG Z M, HOU S Z, WU Y B, et al. LINC01419 promotes cell proliferation and metastasis in lung adenocarcinoma via sponging miR-519b-3p to up-regulate RCCD1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 520(1): 107-14.