DOI:10.16016/j.1000-5404.202103147

香叶木素调控 STX17-AS1/miR-383-5p 轴对结直肠癌细胞增殖、凋亡和迁移的影响

吴 远[1],刘吉宇[1],张 琴[2] 563000 贵州 遵义,遵义市第一人民医院(遵义医科大学第三附属医院):肛肠科[1],肿瘤科[2]

[**摘要**] **目的** 探讨香叶木素对结直肠癌细胞增殖、凋亡和迁移的影响,分析其机制是否与调控 STX17-AS1/miR-383-5p 轴有关。**方法** 通过细胞计数试剂盒(CCK-8)、集落形成实验、划痕愈合实验、流式细胞术、实时定量 PCR(RT-qPCR)分析香叶木素(10、20、40 μmol/L)对结直肠癌细胞 HCT116 的活力、集落形成数、划痕愈合率、凋亡以及 STX17-AS1、miR-383-5p 表达的影响。RT-qPCR 分析 2019 年本院 29 例结直肠癌患者癌组织和对应癌旁组织中 STX17-AS1、miR-383-5p 相对水平。双荧光素酶报告实验分析 STX17-AS1 和 miR-383-5p 的靶向关系。分别转染 STX17-AS1 的小干扰 RNA、miR-383-5p 模拟物至 HCT116 细胞,观察抑制 STX17-AS1 或过表达 miR-383-5p 对 HCT116 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**结果** 香叶木素(10、20、40 μmol/L)处理显著降低 HCT116 细胞活力、集落形成数、划痕愈合率($P<0.05$),增加细胞凋亡率($P<0.05$),降低 STX17-AS1 表达水平($P<0.05$),增加 miR-383-5p 表达水平($P<0.05$)。结直肠癌组织中 STX17-AS1 的表达水平较癌旁组织显著升高($P<0.05$),miR-383-5p 的表达水平较癌旁组织显著降低($P<0.05$)。STX17-AS1 与 miR-383-5p 直接结合。抑制 STX17-AS1 表达显著降低 HCT116 细胞活力、集落形成数、划痕愈合率($P<0.05$),增加细胞凋亡率($P<0.05$),增加 miR-383-5p 表达水平($P<0.05$)。过表达 miR-383-5p 显著降低 HCT116 细胞活力、集落形成数、划痕愈合率($P<0.05$),增加细胞凋亡率($P<0.05$)。过表达 STX17-AS1 或抑制 miR-383-5p 表达显著减弱香叶木素对 HCT116 细胞活力、集落形成数、划痕愈合率和凋亡率的影响($P<0.05$)。**结论** 香叶木素通过下调 STX17-AS1/miR-383-5p 轴可抑制结直肠癌细胞增殖和迁移,诱导细胞凋亡。

[**关键词**] 香叶木素;结直肠癌;STX17-AS1;miR-383-5p;细胞增殖;迁移;凋亡

[**中图法分类号**] R73-361; R735.35; R977.7 [**文献标志码**] A

Effect of diosmetin on proliferation, apoptosis and migration of colorectal cancer cells by regulating STX17-AS1/miR-383-5p axis

WU Yuan[1], LIU Jiyu[1], ZHANG Qin[2] [1]Department of Anorectal Disorders, [2]Department of Oncology, Zunyi First People's Hospital (Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University), Zunyi, Guizhou Province, 563000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of diosmetin on the proliferation, apoptosis and migration of colorectal cancer cells, and further to analyze whether its mechanism is related to the regulation of STX17-AS1/miR-383-5p axis. **Methods** Cell counting kit (CCK-8) assay, colony formation test, scratch healing test, flow cytometry and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) were used to analyze the effects of diosmetin (10, 20 and 40 μmol/L) on cell viability, colony formation, scratch healing rate, apoptosis, and STX17-AS1 and miR-383-5p expression in HCT116 cells. The relative expression levels of STX17-AS1 and miR-383-5p in cancer tissues and adjacent tissues of 29 patients with colorectal cancer in our hospital were assessed using RT-qPCR. Dual luciferase reporter assay system was employed to analyze the targeting relationship between STX17-AS1 and miR-383-5p. The small interfering RNA of STX17-AS1 and miR-383-5p

[**通信作者**] 吴 远,E-mail:wuyuanyuanzhi@126.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

mimics of STX17-AS1 were transfected into HCT116 cells respectively, and the effects of STX17-AS1 inhibition or miR-383-5p overexpression on the proliferation, apoptosis and migration of HCT116 cells were also analyzed. **Results** Diosmetin treatment (10, 20, 40 μmol/L) significantly reduced cell viability, colony formation numbers and scratch healing rate ($P<0.05$), increased cell apoptotic rate ($P<0.05$), decreased STX17-AS1 expression level ($P<0.05$), and increased the expression level of miR-383-5p in HCT116 cells ($P<0.05$). The expression level of STX17-AS1 was significantly higher ($P<0.05$), and that of miR-383-5p was significantly lower in the colorectal cancer tissues than the adjacent tissues ($P<0.05$). STX17-AS1 directly bound to miR-383-5p. Inhibition of STX17-AS1 significantly reduced cell viability, colony formation numbers and scratch healing rate ($P<0.05$), increased cell apoptotic rate ($P<0.05$), and enhanced the miR-383-5p expression level in HCT116 cells ($P<0.05$). While, miR-383-5p overexpression significantly reduced cell viability, colony formation numbers and scratch healing rate ($P<0.05$), and increased cell apoptosis rate in the cells ($P<0.05$). Overexpression of STX17-AS1 or inhibition of miR-383-5p significantly weakened the effect of diosmetin on the above indicators of HCT116 cells ($P<0.05$). **Conclusion** Diosmetin inhibits the proliferation and migration of colorectal cancer cells and induces apoptosis by down-regulating the STX17-AS1/miR-383-5p axis.

[**Key words**] diosmetin; colorectal cancer; STX17-AS1; miR-383-5p; cell proliferation; migration; apoptosis

Corresponding author: WU Yuan, E-mail: wuyuanyuanzhi@126.com

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)发病率、死亡率在全球恶性肿瘤排行榜中分别居第三位和第四位[1]。手术、放疗或辅助化疗是临床常用的CRC治疗手段,然而化疗药物的长期使用往往产生较大的毒副作用。此外,化疗耐药可诱发CRC复发和转移,导致治疗失败[2]。香叶木素是一种存在于豆类、橄榄叶和柑橘类植物中的天然类黄酮,其对乳腺癌、鼻咽癌多种肿瘤细胞具有细胞毒性作用[3-4]。研究表明香叶木素可诱导CRC细胞凋亡,抑制裸鼠移植瘤形成[5-6]。但香叶木素对CRC细胞迁移的影响及其对抗CRC的确切机制尚不清楚。非编码RNA(ncRNA)是蛋白编码能力缺失的功能性RNA,主要包括长链ncRNA(lncRNA)和微小RNA(miRNA)。多项研究表明lncRNA、miRNA的表达失调与肿瘤细胞的增殖失控、凋亡抵抗和异常转移有关,是癌症治疗的潜在靶点[7]。有报道指出lncRNA STX17-AS1在CRC组织中表达上调,STX17-AS1高表达可增加CRC细胞的增殖和转移能力,具有致癌作用[8]。靶基因预测到miR-383-5p是STX17-AS1的潜在靶点。已有研究证实miR-383-5p在CRC患者血清中低表达,上调miR-383-5p可提高CRC患者新辅助化疗的敏感性[9]。然而,STX17-AS1是否靶向miR-383-5p调控CRC细胞增殖、凋亡和迁移并不清楚。本研究分析了香叶木素对CRC细胞增殖、凋亡、迁移以及STX17-AS1、miR-383-5p表达的影响,并以STX17-AS1/miR-383-5p为切入点探讨香叶木素抗CRC的潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织来源 本研究收集2019年1-12月在本院确诊且接受手术治疗的29例CRC患者(男性19例,女性10例,年龄36~68岁,中位年龄53岁)的癌组织和癌旁组织。患者术前均未接受化疗或放疗,患者或其家属均签订了书面知情同意书,本研究的开展获得本院医学伦理委员会的批准[伦理(2018)-16号]。组织样本切除后立即置于液氮中冷冻,后保存在-80 ℃冰箱直到用于实验。

1.1.2 细胞和试剂 人结直肠癌细胞HCT116购自中国科学院上海细胞库;香叶木素(纯度为95.7%,批号111788-200801)购于中国食品药品检定研究院;Lipofectamine2000、TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司;STX17-AS1的小干扰RNA(si-STX17-AS1)、小干扰RNA阴性对照(si-NC)、miR-383-5p模拟物(mimics)、miRNA模拟物阴性对照(miR-NC)、miR-383-5p抑制物(anti-miR-383-5p)、STX17-AS1过表达质粒(pcDNA-STX17-AS1)、荧光素酶报告载体购自上海吉玛制药公司;细胞计数试剂盒(CCK-8)购自上海碧云天生物公司;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(AnnexinV-FITC)/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒购于北京百奥莱博生物公司;TaqMan miRNA检测试剂盒购于美国Thermo Fisher公司;SYBR Green qPCR Master Mix试

剂盒、逆转录试剂盒购于美国 MCE 公司;兔源 Cleaved Caspase-3 多克隆抗体(ab2302)、兔源 GAPDH 多克隆抗体(ab9485)、山羊抗兔 IgG 二抗(ab128915)、双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于美国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染和分组 HCT116 细胞采用 DMEM 培养基(补充 10%胎牛血清、1%青链霉素)在含 5% CO_2、37 ℃、饱和湿度的培养箱中培养,每周换液 2~3 次,0.25%胰蛋白酶消化 80%融合细胞,1∶3比例传代。将第 5 代对数期 HCT116 细胞以 2×10^5 个/孔密度接种 6 孔板,细胞 50% 融合时按照 Lipofectamine 2000 使用说明分别转染 si-STX17-AS1、si-NC、miR-383-5p mimics、miR-NC、anti-miR-383-5p、pcDNA-STX17-AS1 至 HCT116 细胞,转染 48 h 后,RT-qPCR 检测转染效果。

实验分组:正常培养的 HCT116 细胞记为对照组;用含 10、20、40 μmol/L 香叶木素的培养液孵育 HCT116 细胞 24 h[3],分别记为香叶木素 10 μmol/L 组、20 μmol/L 组、40 μmol/L 组;转染 si-STX17-AS1、转染 si-NC、转染 miR-383-5p mimics、转染 miR-NC 的 HCT116 细胞依次记为 si-STX17-AS1 组、si-NC 组、miR-383-5p 组、miR-NC 组;用含 40 μmol/L 香叶木素的培养液孵育转染 pcDNA-STX17-AS1、转染 anti-miR-383-5p 的 HCT116 细胞 24 h,依次记为香叶木素+pcDNA-STX17-AS1 组、香叶木素+anti-miR-383-5p 组。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞活力 将 5×10^3 个转染或未转染 HCT116 细胞接种于 96 孔板,细胞贴壁后按照实验分组加入对应浓度的香叶木素孵育细胞,24 h 后,更换为新鲜培养液,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,继续孵育 2.5 h。酶标仪分析各孔波长 450 nm 处光密度值[$D(450)$]表示细胞活力。

1.2.3 集落形成实验检测细胞克隆能力 将各组 HCT116 细胞按照 3×10^2 个/孔接种到 6 孔板,轻轻旋动平板使细胞分散均匀。放入 37 ℃、含 5% CO_2 培养箱孵育 2 周。每 3 天更换新鲜培养基。当出现肉眼可见细胞集落时终止培养。PBS 清洗细胞后,室温下用 4%多聚甲醛固定细胞集落 15 min,姬姆萨染色 20 min。显微镜下统计大于 50 个细胞的集落数表示细胞克隆能力。

1.2.4 划痕愈合实验检测细胞迁移 将各组 HCT116 细胞按照 1×10^4 个/孔接种到 6 孔板,培养 24 h 后细胞的融合度达到 80%左右。用 100 μL 移液枪头在细胞表面划一直线。用培养基洗涤 2 次,以去除细胞碎片。显微镜下测量初始划痕距离。放入 37 ℃、含 5% CO_2 培养箱孵育 48 h,显微镜下测量 48 h 划痕距离。

划痕愈合率=(划痕距离$_{初始}$-划痕距离$_{48\ h}$)/划痕距离初始×100%

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 用预冷的 PBS 洗涤各组 HCT116 细胞 2 次,悬于 1×结合缓冲液中使细胞数达到 1×10^6 个/mL。将 5 μL 的 Annexin V-FITC、5 μL 的 PI 依次加入到 100 μL 细胞悬液重悬,室温避光孵育 15 min,补加 400 μL 的 1×结合缓冲液混匀。1 h 内上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.6 蛋白质印迹法检测 Cleaved-Caspase3 蛋白表达 RIPA 裂解液提取各组 HCT116 细胞的总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μg 变性蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),并转移分离的蛋白至 PVDF 膜上。然后用 5%脱脂牛奶在 4 ℃下孵育 PVDF 膜过夜,然后将膜与一抗(Cleaved-Caspase3 抗体 1∶500 稀释,内参 GAPDH 抗体 1∶1 000 稀释)室温下孵育 2 h,再与辣根过氧化物酶结合的二抗(1∶10 000 稀释)在室温下孵育 2 h。化学发光法进行条带显色,凝胶成像系统捕获图像,Image J 软件对目的蛋白灰度值进行量化分析。

1.2.7 实时定量 PCR(RT-qPCR)检测 STX17-AS1、miR-383-5p 表达 采用 TRIzol 试剂从临床组织样本、各组 HCT116 细胞中提取总 RNA,利用逆转录试剂盒将 1 μg 总 RNA 反转录为 cDNA。利用 SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒检测 STX17-AS1 表达水平。利用 TaqMan miRNA 检测试剂盒检测 STX17-AS1 表达水平。GAPDH、U6 分别作为 STX17-AS1、miR-383-5p 的内参对照,$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 STX17-AS1、miR-383-5p 的相对水平。STX17-AS1 上游引物 5′-TGATAAGCTGTTTAAACCAGAACCG-3′,下游引物 5′-GGCAACATTTCAGTTCCAGTG-3′;GAPDH 上游引物 5′-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3′,下游引物 5′-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3′;miR-383-5p 上游引物 5′-GGGAGATCAGAAGGTGATTGTGGCT-3′,下游引物 5′-CAGTGCGTGTCGTGGAGT-3′;U6 上游引物 5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′,下游引物 5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′。

1.2.8 双荧光素酶报告实验 根据 Starbase 数据库预测的 STX17-AS1 与 miR-383-5p 的结合位点,合成含有 miR-383-5p 结合位点序列的野生型(wt)或突变型(mut)STX17-AS1 序列,上述序列分别插入荧光素酶基本载体 pGL3 得到荧光素酶报告质粒 wt-STX17-AS1、mut-STX17-AS1。然后将荧光素酶报告质粒分别与 miR-383-5p mimics、miR-NC 共转染 HCT116 细胞。

转染 48 h 后,采用双荧光素酶报告基因检测系统分析各组 HCT116 细胞的相对荧光素酶活性。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 18.0 进行统计分析,以 3 次独立重复实验的 $\bar{x}\pm s$ 表示各组数据,两组数据比较采用独立样本 t 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析和 LSD-t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　香叶木素对结直肠癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响

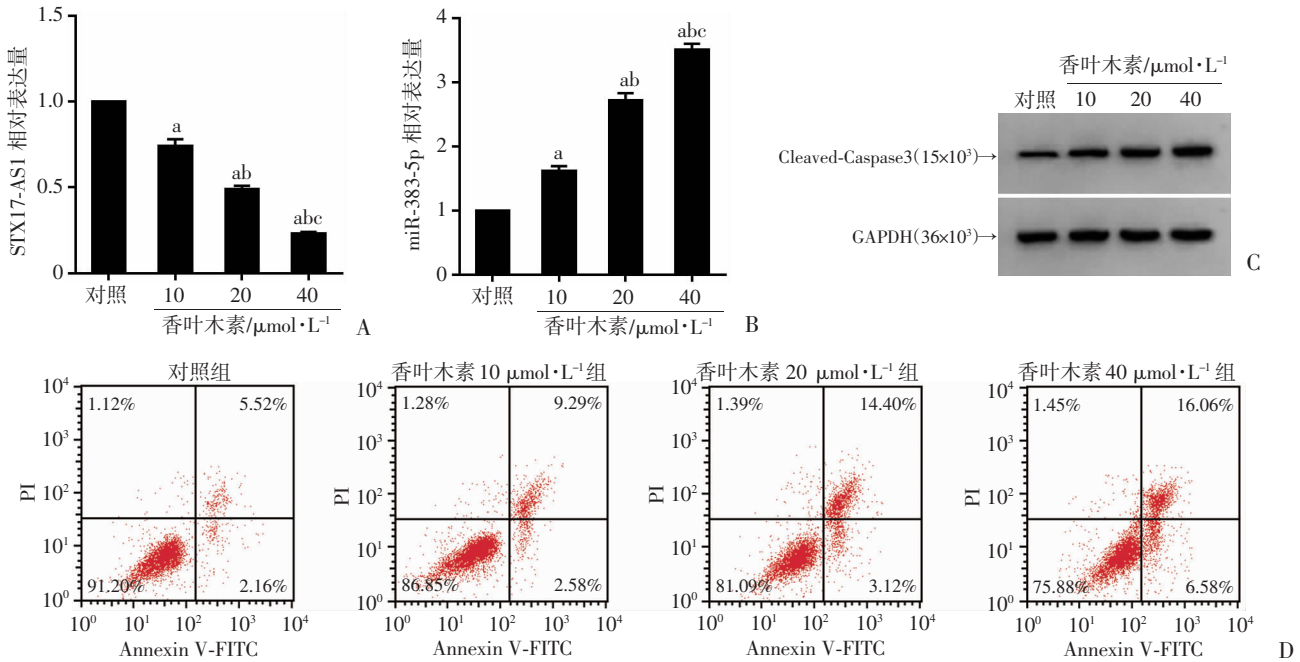
与对照组比较,香叶木素 10 μmol/L 组、20 μmol/L 组、40 μmol/L 组 HCT116 细胞活力、集落形成数、划痕愈合率、STX17-AS1 的相对水平均显著降低($P<0.05$),凋亡率、Cleaved-Caspase3 蛋白表达、miR-383-5p 的相对水平显著升高($P<0.05$)。见图 1 和表 1。

2.2　STX17-AS1 和 miR-383-5p 在结直肠癌中的表达

结直肠癌组织中 STX17-AS1 的相对水平较癌旁组织显著升高($P<0.05$),miR-383-5p 的相对水平较癌旁组织显著降低($P<0.05$),见图 2A 和 2B。结直肠癌组织中 STX17-AS1、miR-383-5p 表达水平呈负相关关系,见图 2C。

2.3　STX17-AS1 和 miR-383-5p 靶向关系的验证

Starbase 预测到 miR-383-5p 与 STX17-AS1 序列间存在特异性结合位点,见图 3A。荧光素酶活性检测结果见图 3B,miR-383-5p mimics 与 wt-STX17-AS1 共转染组的细胞相对荧光素酶活性显著低于 miR-NC 与 wt-STX17-AS1 共转染组($P<0.05$);miR-383-5p mimics 与 mut-STX17-AS1 共转染组的细胞相对荧光素酶活性同 miR-NC 与 mut-STX17-AS1 共转染组相比差异无统计学意义。



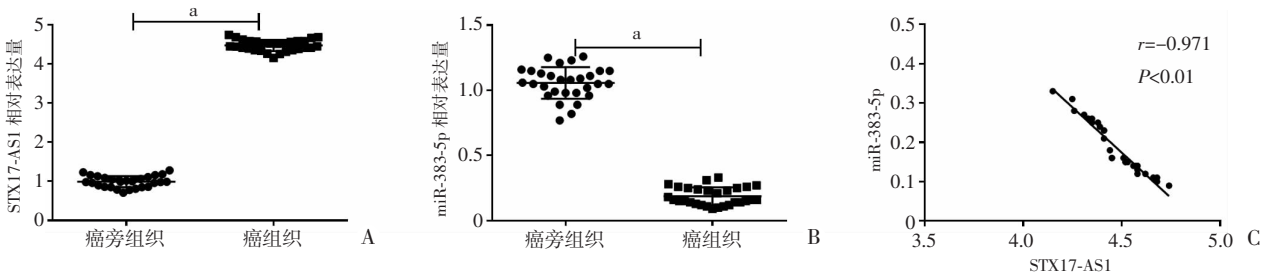
a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与香叶木素 10 μmol/L 组比较;c:$P<0.05$,与香叶木素 20 μmol/L 组比较
A:香叶木素抑制结直肠癌细胞中 STX17-AS1 的表达;B:香叶木素促进结直肠癌细胞中 miR-383-5p 的表达;C:香叶木素促进结直肠癌细胞中 Cleaved-Caspase3 蛋白的表达;D:香叶木素诱导结直肠癌细胞凋亡

图 1　香叶木素对细胞凋亡的影响

表 1　香叶木素可抑制细胞增殖迁移诱导凋亡($\bar{x}\pm s$)

组别	STX17-AS1	miR-383-5p	D(450)值	集落形成数(个)	划痕愈合率(%)	凋亡率(%)	Cleaved-Caspase3
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	0.87±0.08	127.56±4.32	64.23±1.02	7.68±0.57	0.18±0.01
香叶木素 10 μmol/L 组	0.73±0.05^{a}	1.88±0.12^{a}	0.63±0.03^{a}	102.44±2.71^{a}	50.65±0.71^{a}	11.87±0.60^{a}	0.40±0.03^{a}
香叶木素 20 μmol/L 组	0.45±0.03^{ab}	2.67±0.15^{ab}	0.47±0.03^{ab}	82.44±1.42^{ab}	39.89±0.65^{ab}	17.52±0.67^{ab}	0.63±0.03^{ab}
香叶木素 40 μmol/L 组	0.14±0.02^{abc}	4.21±0.21^{abc}	0.31±0.02^{abc}	61.56±1.34^{abc}	29.36±0.56^{abc}	22.67±0.83^{abc}	0.83±0.05^{abc}
F 值	1292.842	825.630	238.884	958.799	3515.774	846.272	648.546
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与香叶木素 10 μmol/L 组比较;c:$P<0.05$,与香叶木素 20 μmol/L 组比较



A:STX17-AS1 在结直肠癌组织中高表达;B:miR-383-5p 在结直肠癌组织中低表达;C:STX17-AS1 和 miR-383-5p 负相关;a:$P<0.05$

图 2　STX17-AS1 和 miR-383-5p 表达的检测($n=29$)



A:STX17-AS1 和 miR-383-5p 互补序列;B:荧光素酶活性检测　a:$P<0.05$,与 miR-NC 比较

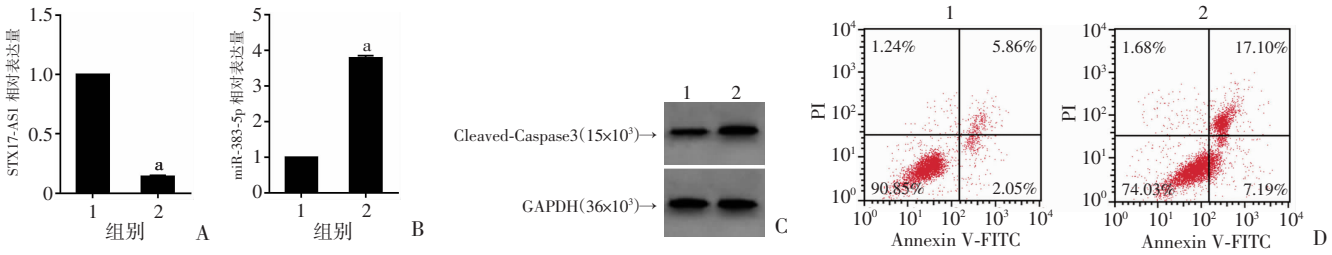
图 3　STX17-AS1 和 miR-383-5p 靶向关系的验证

2.4　抑制 STX17-AS1 对结直肠癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响

与 si-NC 组比较,si-STX17-AS1 组 HCT116 细胞 STX17-AS1 的相对水平、细胞活力、集落形成数、划痕愈合率均显著降低($P<0.05$),凋亡率、Cleaved-Caspase3 蛋白表达、miR-383-5p 的相对水平显著升高($P<0.05$),见图 4 和表 2。

2.5　过表达 miR-383-5p 对结直肠癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响

与 miR-NC 组比较,miR-383-5p 组 HCT116 细胞 miR-383-5p 的相对水平、凋亡率、Cleaved-Caspase3 蛋白表达显著升高($P<0.05$),细胞活力、集落形成数、划痕愈合率均显著降低($P<0.05$),见图 5 和表 3。



1:si-NC 组;2:si-STX17-AS1 组;a:$P<0.05$,与 si-NC 组比较

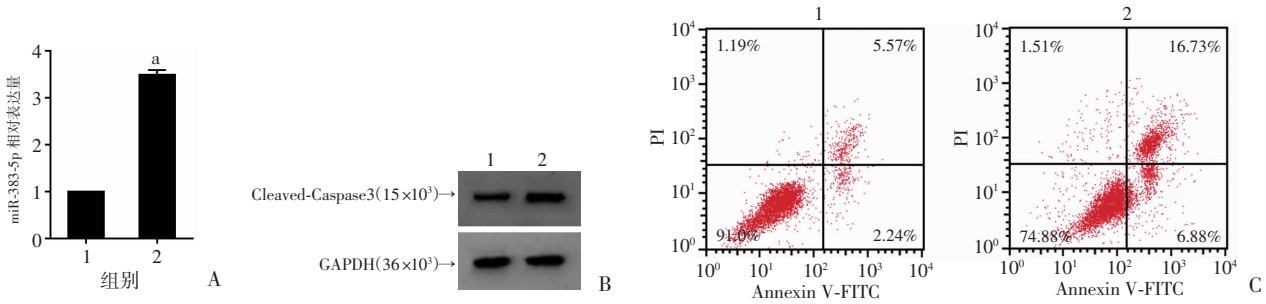
A:抑制 STX17-AS1 处理后 STX17-AS 表达量降低;B:抑制 STX17-AS1 处理后 miR-383-5p 表达量升高;C:抑制 STX17-AS1 可促进 Cleaved-Caspase3 蛋白的表达;D:抑制 STX17-AS1 可诱导凋亡

图 4　抑制 STX17-AS1 对细胞凋亡的影响

表 2　抑制 STX17-AS1 可抑制细胞增殖、迁移,诱导凋亡($\bar{x}\pm s$)

组别	D(450)值	集落形成数(个)	划痕愈合率(%)	凋亡率(%)	Cleaved-Caspase3
si-NC 组	0.88±0.07	126.89±6.03	64.38±1.32	7.91±0.58	0.17±0.01
si-STX17-AS1 组	0.24±0.02[a]	53.22±1.75[a]	24.55±0.86[a]	24.29±0.83[a]	0.96±0.05[a]

a:$P<0.05$,与 si-NC 组比较



1:miR-NC 组;2:miR-383-5p 组

A:过表达 miR-383-5p 处理后 miR-383-5p 表达量的检测　a:$P<0.05$,与 miR-NC 组比较;B:过表达 miR-383-5p 可促进 Cleaved-Caspase3 蛋白的表达;C:过表达 miR-383-5p 可诱导凋亡

图 5　miR-383-5p 对细胞凋亡的影响

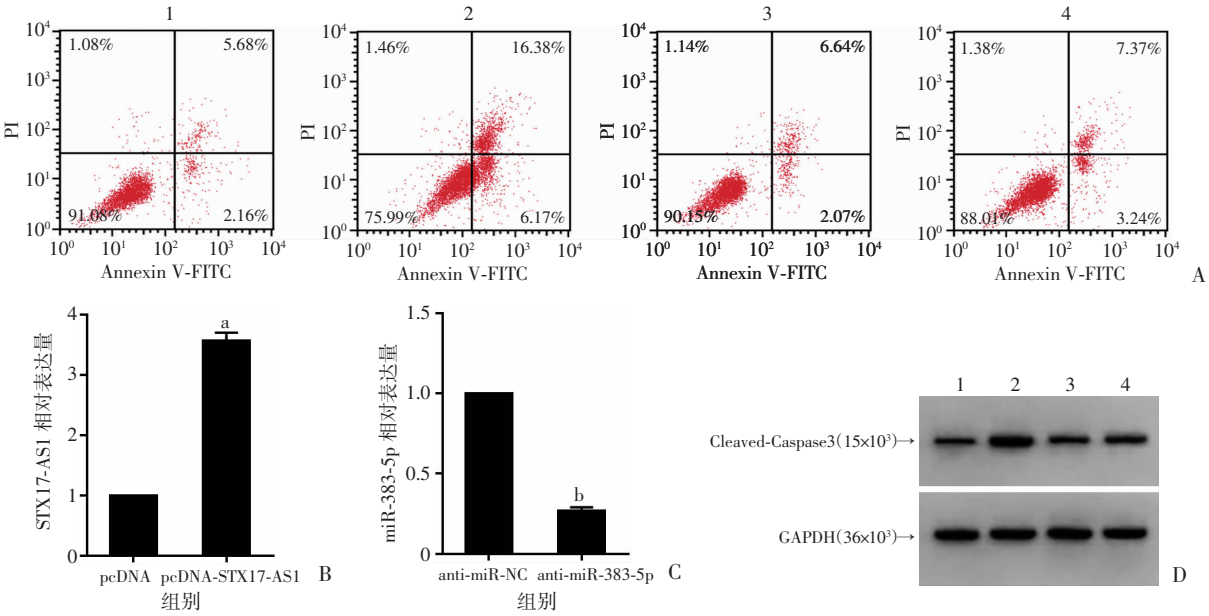
表 3　miR-383-5p 可抑制细胞增殖、迁移,诱导凋亡($\bar{x}\pm s$)

组别	D(450)值	集落形成数(个)	划痕愈合率(%)	凋亡率(%)	Cleaved-Caspase3
miR-NC 组	0.90±0.05	127.89±4.41	64.18±1.05	7.81±0.56	0.18±0.02
miR-383-5p 组	0.35±0.01[a]	57.56±2.01[a]	26.80±0.65[a]	23.61±0.73[a]	0.87±0.05[a]

a:$P<0.05$,与 miR-NC 组比较

2.6　过表达 STX17-AS1 或抑制 miR-383-5p 逆转香叶木素对结直肠癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响

转染 pcDNA-STX17-AS1 后 HCT116 细胞中 STX17-AS1 的相对水平较转染 pcDNA 显著升高($P<0.05$);转染 anti-miR-383-5p 后 HCT116 细胞中 miR-383-5p 的相对水平较转染 anti-miR-NC 显著降低($P<0.05$)。与对照组比较,香叶木素组 HCT116 细胞活力、集落形成数、划痕愈合率显著降低($P<0.05$),凋亡率、Cleaved-Caspase3 蛋白表达显著升高($P<0.05$);与香叶木素组比较,香叶木素+pcDNA-STX17-AS1 组、香叶木素+anti-miR-383-5p 组 HCT116 细胞活力、集落形成数、划痕愈合率显著升高($P<0.05$),凋亡率、Cleaved-Caspase3 蛋白表达显著降低($P<0.05$),见图 6 和表 4。



1:对照组;2:香叶木素组;3:香叶木素+pcDNA-STX17-AS1 组;4:香叶木素+anti-miR-383-5p 组

A:过表达 STX17-AS1 或抑制 miR-383-5p 可减弱香叶木素对细胞凋亡的诱导作用;B:过表达 STX17-AS1 处理后 STX17-AS1 表达量的检测　a:$P<0.05$,与 pcDNA 组比较;C:抑制 miR-383-5p 处理后 miR-383-5p 表达量的检测　b:$P<0.05$,与 anti-miR-NC 组比较;D:过表达 STX17-AS1 或抑制 miR-383-5p 可减弱香叶木素对细胞中 Cleaved-Caspase3 蛋白的促进作用

图 6　STX17-AS1 或抑制 miR-383-5p 对香叶木素处理的细胞凋亡的影响

表 4 STX17-AS1 或抑制 miR-383-5p 可逆转香叶木素对细胞增殖、迁移、凋亡的作用($\bar{x}\pm s$)

组别	D(450)值	集落形成数(个)	划痕愈合率(%)	凋亡率(%)	Cleaved-Caspase3
对照组	0.87±0.07	127.22±4.10	64.41±1.00	7.84±0.50	0.18±0.01
香叶木素组	0.31±0.03[a]	62.44±1.83[a]	29.27±0.67[a]	22.55±0.98[a]	0.81±0.05[a]
香叶木素+pcDNA-STX17-AS1 组	0.75±0.05[b]	114.44±2.75[b]	59.26±0.76[b]	8.71±0.26[b]	0.24±0.02[b]
香叶木素+anti-miR-383-5p 组	0.65±0.04[b]	103.33±3.16[b]	54.76±1.33[b]	10.61±0.56[b]	0.27±0.02[b]
F 值	210.788	750.253	2 311.104	1 060.316	905.294
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与香叶木素组比较

3 讨论

香叶木素通过调控细胞存活、周期进展、凋亡、血管生成等多种细胞过程在多种恶性肿瘤中表现出抗癌活性[10]。CHOI 等[11]指出香叶木素可有效抑制黑色素瘤细胞、人脐静脉内皮细胞增殖和迁移,抑制肿瘤进展过程中肿瘤血管的生长和扩张,显著延缓肿瘤生长。杨阳等[12]指出香叶木素明显抑制肝癌细胞增殖,诱导 G_2/M 期阻滞和细胞凋亡。香叶木素通过下调基质金属蛋白酶 2(MMP-2)和 MMP-9 表达水平来抑制肝癌细胞转移[13]。本研究结果表明,香叶木素处理显著降低 CRC 细胞 HCT116 活力、集落形成能力和迁移能力,增加细胞凋亡率,上调促凋亡蛋白 Cleaved-Caspase3 的表达水平,且表现出明显的剂量依赖性,这与 KOOSHA 等[5]的研究结论相符合。以上结果表明,香叶木素对 CRC 细胞具有促凋亡、抗增殖、抗迁移作用。

lncRNA 富含 miRNA 的结合位点,其通过或靶向 miRNA 间接调控 CRC 进展的多个过程[14-15]。本研究发现 CRC 组织中 STX17-AS1 相对水平显著上调,而 miR-383-5p 的相对水平显著下调,表明 STX17-AS1、miR-383-5p 可能参与 CRC 发生。此外,荧光素酶报告实验证实 miR-383-5p 是 STX17-AS1 的靶基因,提示 CRC 中可能存在 STX17-AS1/miR-383-5p 调控分子轴。体外功能检测显示,抑制 STX17-AS1 表达显著降低 HCT116 细胞增殖和迁移能力,促进 Cleaved-Caspase3 蛋白表达和细胞凋亡,与 WANG 等[8]报道抗肿瘤作用一致。miR-383-5p 已被鉴定为胃癌、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤的抑制因子[16-18]。据报道 miR-383-5p 表达水平与胃癌肿瘤大小和分化程度显著相关,miR-383-5p 低表达胃癌患者的生存时间较短[19]。miR-383-5p 通过靶向 TRIM27 抑制卵巢癌细胞增殖并增强其化疗敏感性[20]。此外,miR-383-5p 介导抑制 LINC00096 表达对三阴性乳腺癌细胞增殖和迁移的抑制作用[21]。本研究表明,过表达 miR-383-5p 显著降低 HCT116 细胞增殖和迁移能力,促进 Cleaved-Caspase3 蛋白表达和细胞凋亡,与 HUANG 等[22]报道的抗癌作用一致。香叶木素处理后 HCT116 细胞中 STX17-AS1 表达以浓度依赖方式降低,而 miR-383-5p 表达以浓度依赖方式增加,且沉默 STX17-AS1、过表达 miR-383-5p 与香叶木素对 CRC 细胞的抗肿瘤效果一致,表明香叶木素可能通过调控 STX17-AS1/miR-383-5p 在 CRC 中发挥抗肿瘤作用。回复实验显示,过表达 STX17-AS1 或抑制 miR-383-5p 表达均可逆转香叶木素对 HCT116 细胞的增殖、迁移、凋亡以及 Cleaved-Caspase3 蛋白表达的影响,进一步说明香叶木素通过 STX17-AS1/miR-383-5p 轴可调控 CRC 细胞恶性生物学行为。

总之,本研究证实香叶木素可抑制 CRC 细胞增殖和迁移,促进细胞凋亡,其机制与下调 STX17-AS1/miR-383-5p 轴有关。这些发现为开发香叶木素防治 CRC 提供了理论依据,为 CRC 的基因治疗提供潜在靶点。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30. DOI:10.3322/caac.21590.

[2] RATHORE R, MCCALLUM J E, VARGHESE E, *et al*. Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs)[J]. Apoptosis, 2017, 22(7): 898-919. DOI:10.1007/s10495-017-1375-1.

[3] 王春景, 盛月, 周强, 等. 香叶木素通过线粒体凋亡途径对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(2): 149-155. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2020.02.005.
WANG C J, SHENG Y, ZHOU Q, *et al*. The effect of geraniol on the proliferation and apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial apoptotic pathway[J]. Tradit Chin Drug Res Pharmacol, 2020, 31(2): 149-155. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2020.02.005.

[4] 周本益, 戴珊, 陈斌. 香叶木素通过调控 p38 JNK 信号通路对鼻咽癌 CNE2 细胞凋亡和增殖的影响[J]. 解放军医

药杂志, 2020, 32(6): 24-28. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2020.06.005.
ZHOU B Y, DAI S, CHEN B. The effect of geraniol on the apoptosis and proliferation of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells by regulating the p38 JNK signaling pathway[J]. Med J PLA, 2020, 32(6): 24-28. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2020.06.005.

[5] KOOSHA S, MOHAMED Z, SINNIAH A, *et al*. Evaluation of anti-tumorigenic effects of diosmetin against human colon cancer xenografts in athymic nude mice[J]. Molecules, 2019, 24(14): 2522-2532. DOI: 10.3390/molecules24142522.

[6] KOOSHA S, MOHAMED Z, SINNIAH A, *et al*. Investigation into the molecular mechanisms underlying the anti-proliferative and anti-tumorigenesis activities of diosmetin against HCT-116 human colorectal cancer[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 5148. DOI:10.1038/s41598-019-41685-1.

[7] CAO H L, LIU Z J, HUANG P L, *et al*. lncRNA-RMRP promotes proliferation, migration and invasion of bladder cancer *via* miR-206[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(3): 1012-1021. DOI:10.26355/eurrev_201902_16988.

[8] WANG J H, LU T J, KUNG M L, *et al*. The long noncoding RNA LOC441461 (STX17-AS1) modulates colorectal cancer cell growth and motility[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(11): 3171-3181. DOI: 10.3390/cancers12113171.

[9] SUN X, WANG X, DONG G, *et al*. Expression level of miR-383-5p in colorectal cancer patients following neoadjuvant chemotherapy and its clinical significance in the prognosis[J]. Minerva Med, 2020. DOI: 10.23736/S0026-4806.20.06656-2.

[10] WANG C, LI S, REN H, *et al*. Anti-proliferation and pro-apoptotic effects of diosmetin *via* modulating cell cycle arrest and mitochondria-mediated intrinsic apoptotic pathway in MDA-MB-231 cells[J]. Med Sci Monit, 2019, 25(1): 4639-4647. DOI: 10.12659/MSM.914058.

[11] CHOI J, LEE D H, PARK S Y, *et al*. Diosmetin inhibits tumor development and block tumor angiogenesis in skin cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117: 109091. DOI:10.1016/j.biopha.2019.109091.

[12] 杨阳, 林满洲, 黄艺文, 等. 香叶木素诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡及周期阻滞的机制研究[J]. 海南医学, 2016, 27(3): 15-18. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2016.03.004.
YANG Y, LIN M Z, HUANG Y W, *et al*. Study on the mechanism of geraniol inducing apoptosis and cycle arrest of human liver cancer HepG2 cells[J]. Hainan Med, 2016, 27(3): 15-18. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2016.03.004.

[13] LIU J, WEN X, LIU B, *et al*. Diosmetin inhibits the metastasis of hepatocellular carcinoma cells by downregulating the expression levels of MMP-2 and MMP-9[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(3): 2401-2408. DOI:10.3892/mmr.2016.4872.

[14] XU J, MENG Q, LI X, *et al*. Long noncoding RNA MIR17HG promotes colorectal cancer progression *via* miR-17-5p[J]. Cancer Res, 2019, 79(19): 4882-4895. DOI: 10.1158/0008-5472.can-18-3880.

[15] DING D Y, LI C F, ZHAO T C, *et al*. LncRNA H19/miR-29b-3p/PGRN axis promoted epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells by acting on WNT signaling[J]. Mol Cells, 2018, 41(5): 423-435. DOI: 10.14348/molcells.2018.2258.

[16] LI X X, YUAN J P, CAO Q J, *et al*. MicroRNA-383-5p inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of gastric cancer cells by targeting cancerous inhibitor of PP2A[J]. Int J Mol Med, 2020, 46(1): 397-405. DOI:10.3892/ijmm.2020.4603.

[17] ZHANG J, KONG X, SHI Q, *et al*. MicroRNA-383-5p acts as a potential prognostic biomarker and an inhibitor of tumor cell proliferation, migration, and invasion in breast cancer[J]. Cancer Biomark, 2020, 27(4): 423-432. DOI:10.3233/cbm-190704.

[18] ZHAO S S, GAO X Y, ZANG S Z, *et al*. MicroRNA-383-5p Acts as a prognostic marker and inhibitor of cell proliferation in lung adenocarcinoma by cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A[J]. Oncol Lett, 2017, 14(3): 3573-3579. DOI:10.3892/ol.2017.6603.

[19] WEI C, GAO J J. Downregulated miR-383-5p contributes to the proliferation and migration of gastric cancer cells and is associated with poor prognosis[J]. Peer J, 2019, 7: e7882. DOI:10.7717/peerj.7882.

[20] JIANG J, XIE C, LIU Y, *et al*. Up-regulation of miR-383-5p suppresses proliferation and enhances chemosensitivity in ovarian cancer cells by targeting TRIM27[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 595-601. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.148.

[21] TIAN Y, XIA S, MA M, *et al*. LINC00096 promotes the proliferation and invasion by sponging miR-383-5p and regulating RBM3 expression in triple-negative breast cancer[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 10569-10578. DOI: 10.2147/ott.s229659.

[22] HUANG G, GUO X, YANG H. Long noncoding RNA SNHG1 promotes human prostate cancer progression by sponging miR-383-5p[J]. Anticancer Drugs, 2021, 32(3): 286-295. DOI:10.1097/cad.0000000000000916.

(收稿:2021-03-18;修回:2021-05-07)
(编辑 邓强庭)