异鼠李素通过上调SLC25A25-AS1对胃癌发展的影响Δ

张　洋[1*]，王　静[2#]，那丽莎[3]，曾傲然[2]，庞博文[2]，刘禹麟[2]（1.牡丹江医科大学附属红旗医院检验科，黑龙江 牡丹江　157011；2.牡丹江医科大学基础医学院生物学教研室，黑龙江 牡丹江　157011；3.牡丹江医科大学附属红旗医院药学部，黑龙江 牡丹江　157011）

中图分类号　R965；R735.2　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2025）08-0932-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2025.08.07

摘　要　目的　探究异鼠李素通过上调溶质载体家族25成员25反义RNA1（SLC25A25-AS1）对胃癌发展的影响。**方法**　以BALB/c裸鼠为对象，通过腋下接种人胃癌细胞MKN28细胞构建移植瘤模型，考察低、高剂量异鼠李素（20、40 mg/kg）对裸鼠瘤体体积及质量的影响。以MKN28细胞为对象，将其分为对照组、异鼠李素（70 μmol/L，下同）组、异鼠李素+敲减阴性对照组、异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组、异鼠李素+过表达阴性对照组、异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组，考察敲减/过表达SLC25A25-AS1对异鼠李素处理细胞活力、凋亡、迁移和侵袭能力的影响；验证微RNA-212-3p（miR-212-3p）与SLC25A25-AS1、第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物（PTEN）的靶向关系，进一步考察敲减/过表达SLC25A25-AS1对异鼠李素处理细胞中miR-212-3p、PTEN mRNA及蛋白表达的影响。**结果**　与模型对照组比较，异鼠李素低、高剂量组裸鼠的瘤体体积及质量均显著降低，且异鼠李素高剂量组显著低于异鼠李素低剂量组（$P<0.05$）。miR-212-3p与SLC25A25-AS1、PTEN存在靶向关系。与对照组比较，异鼠李素组、异鼠李素+敲减阴性对照组和异鼠李素+过表达阴性对照组的细胞活力（干预24、48 h）、迁移细胞数、侵袭细胞数、miR-212-3p的表达均显著降低或减少或下调，凋亡率、PTEN mRNA及蛋白的表达均显著升高或上调（$P<0.05$）；与异鼠李素组和异鼠李素+敲减阴性对照组比较，异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组的细胞活力、迁移细胞数、侵袭细胞数、miR-212-3p的表达均显著升高或增多或上调，凋亡率、PTEN mRNA及蛋白的表达均显著降低或下调（$P<0.05$）；与异鼠李素组和异鼠李素+过表达阴性对照组比较，异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组的细胞活力、迁移细胞数、侵袭细胞数、miR-212-3p的表达均显著降低或减少或下调，凋亡率、PTEN mRNA及蛋白的表达均显著升高或上调（$P<0.05$）。**结论**　异鼠李素可能通过上调SLC25A25-AS1表达、下调miR-212-3p并上调miR-212-3p下游靶点PTEN的表达，从而抑制胃癌的发展。

关键词　异鼠李素；胃癌；SLC25A25-AS1；miR-212-3p；PTEN

Effects of isorhamnetin on the development of gastric cancer by up-regulating SLC25A25-AS1

ZHANG Yang[1], WANG Jing[2], NA Lisha[3], ZENG Aoran[2], PANG Bowen[2], LIU Yulin[2] (1. Dept. of Clinical Laboratory, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China; 2. Biology Teaching and Research Office, School of Basic Medicine, Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China; 3. Dept. of Pharmacy, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the effects of isorhamnetin on the development of gastric cancer through up-regulation of solute carrier family 25 member 25 antisense RNA 1 (SLC25A25-AS1). **METHODS** Using BALB/c nude mice as the subjects, the xenograft tumor model was established by subcutaneously inoculating human gastric cancer MKN28 cells into the axillary region. The effects of low and high doses of isorhamnetin (20 and 40 mg/kg) on the tumor volume and mass in nude mice were investigated. MKN28 cells were selected and divided into control group, isorhamnetin group (70 μmol/L, similarly hereinafter), isorhamnetin+knocking down negative control group, isorhamnetin+knocking down SLC25A25-AS1 group, isorhamnetin+overexpression negative control group and isorhamnetin+overexpressing SLC25A25-AS1 group. Effects of knocking down/overexpressing SLC25A25-AS1 on viability, apoptosis, migration and invasion ability of isorhamnetin-treated cells were detected. After verifying the targeting relationships between microRNA-212-3p (miR-212-3p) and SLC25A25-AS1, as well as phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN), the effects of knocking down/overexpressing SLC25A25-AS1 on the expression of miR-212-3p, PTEN mRNA, and PTEN protein in isorhamnetin-treated cells were investigated. **RESULTS** Compared with the model control group, tumor volume and mass of nude mice in the isorhamnetin low-dose and high-dose groups were reduced significantly, and the isorhamnetin high-

Δ**基金项目** 黑龙江省自然科学基金项目（No.LH2021C097）

＊**第一作者** 中级检验技师。研究方向：血液肿瘤细胞学检测技术。E-mail：18704532743@163.com

＃**通信作者** 讲师，博士研究生。研究方向：恶性肿瘤发生与防治的分子机制。E-mail：wangjing181719@163.com

dose group was significantly lower than the isorhamnetin low-dose group ($P<0.05$). miR-212-3p had targeting relationships with SLC25A25-AS1 and PTEN. Compared with the control group, the cell viability (intervened for 24, 48 h), migration number, invasion number and miR-212-3p expression of cells in the isorhamnetin group, isorhamnetin+knocking down negative control group and isorhamnetin+overexpressing negative control group were significantly reduced or decreased or down-regulated, while the apoptosis rate, mRNA and protein expressions of PTEN were significantly increased or up-regulated ($P<0.05$). Compared with isorhamnetin group and isorhamnetin+knocking down negative control group, the cell viability, migration number, invasion number and miR-212-3p expression of cells in the isorhamnetin+knocking down SLC25A25-AS1 group were significantly increased or up-regulated, while the apoptosis rate, mRNA and protein expressions of PTEN were significantly reduced or down-regulated ($P<0.05$). Compared with isorhamnetin group and isorhamnetin+overexpressing negative control group, the cell viability, migration number, invasion number and miR-212-3p expression of cells in isorhamnetin+overexpressing SLC25A25-AS1 group were significantly reduced or decreased or down-regulated, while the apoptosis rate, PTEN mRNA and protein expressions were significantly increased or up-regulated ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Isorhamnetin may inhibit the development of gastric cancer by up-regulating the expression of SLC25A25-AS1, down-regulating miR-212-3p, and up-regulating the expression of PTEN, which is a downstream target of miR-212-3p.

KEYWORDS isorhamnetin; gastric cancer; SLC25A25-AS1; miR-212-3p; PTEN

胃癌是一种发病率、死亡率均较高的恶性肿瘤[1]，以幽门螺杆菌感染、基因改变以及饮食、肥胖、吸烟等为主要风险因素[2]。目前，胃癌的主要治疗方法包括手术、化疗、放疗、靶向治疗和免疫疗法等，虽能让患者有所获益，但临床仍面临预后差、复发率高等严重问题[3]，故开发减缓胃癌进展和降低胃癌患者死亡率的新策略具有重要意义。

天然药物具有靶点多、途径多、副作用小等优点，是抗肿瘤药物筛选的重要来源，已成为近年来临床相关研究的热点[4]。异鼠李素是从沙棘、银杏和多枝柽柳等植物中分离出的天然产物，也是槲皮素在哺乳动物体内的直接代谢产物，具有调节免疫、抗炎、保护心脑血管等作用[5]。近期，异鼠李素因能够抑制胃癌、结直肠癌、皮肤癌、肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤的发展而受到学界的广泛关注[6]。由此可见，深入探究异鼠李素抑制胃癌发展的具体机制，可为胃癌治疗药物的研发提供新思路。

长链非编码RNA（long non-coding RNA，lncRNA）是一类长度超过200个核苷酸的RNA，可参与调节细胞表观遗传学特征和细胞周期、细胞分化等功能[7]。研究指出，诸多lncRNA在胃癌细胞中呈差异表达，可参与调节其病理过程，从而发挥抗癌或促癌作用[8]。溶质载体家族25成员25反义RNA1（solute carrier family 25 member 25 antisense RNA 1，SLC25A25-AS1）是学者近年发现的与恶性肿瘤进展密切相关的lncRNA，其对恶性肿瘤发生发展的影响具有两面性，如可促进非小细胞肺癌的发展、抑制结肠癌的发展[9—10]。本课题组前期通过生物信息学分析发现，异鼠李素可使SLC25A25-AS1在胃癌细胞中的表达上调[11]，但该成分能否通过上调SLC25A25-AS1的表达来发挥抑癌作用尚不清楚。研究指出，lncRNA作为微RNA（microRNA，miR）的分子海绵，可通过相互结合来调节相关靶基因的表达[12]。本研究前期亦通过生物信息学预测了SLC25A25-AS1的靶miR，发现miR-212-3p与SLC25A25-AS1具有潜在结合位点。研究表明，miR-212-3p可促进胃癌的发展[13]；此外，肿瘤抑制因子第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物（phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10，PTEN）是miR-212-3p的下游靶点[14]。然而，异鼠李素能否介导SLC25A25-AS1调节miR-212-3p/PTEN轴，从而发挥抗胃癌作用尚未明确。基于此，本研究拟检测不同浓度异鼠李素对人胃癌细胞MKN28移植瘤生长及体外恶性生物学行为的影响，并基于SLC25A25-AS1和miR-212-3p/PTEN轴初步探讨该成分发挥抗胃癌作用的潜在机制，以期为异鼠李素在胃癌临床治疗中的应用研究提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Attune NxT型流式细胞仪和BB15型细胞培养箱均购自美国Thermo Fisher Scientific公司；Synergy H1型酶标仪购自美国BioTek公司；VeritiPro型普通聚合酶链式反应（PCR）仪和7500型荧光定量PCR仪均购自美国ABI公司；E100型光学显微镜购自日本Nikon公司；ChemiDoc型凝胶扫描成像系统购自美国Bio-Rad公司；GloMax 20/20型化学发光仪购自美国Promega公司。

1.2 主要药品与试剂

异鼠李素对照品（纯度99.94%，批号HY-N0776）购自美国MCE公司；胎牛血清、RPMI-1640培养基（批号分别为10091148、11875093）均购自美国Gibco公司；CCK-8试剂盒、Annexin Ⅴ-FITC细胞凋亡检测试剂盒、RIPA裂解液、BCA蛋白浓度检测试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）凝胶配制试剂盒、超敏ECL化学发光试剂盒（批号分别为C0037、C1062M、P0013B、P0009、P0012A、P0018M）均购自上海

碧云天生物技术有限公司；RNAiso Plus提取试剂、逆转录试剂盒、实时荧光定量PCR（real-time fluorogenic quantitative PCR，RT-qPCR）试剂盒（批号分别为9108、RR092A、CN830S）均购自日本Takara公司；兔抗PTEN单克隆抗体、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）多克隆抗体（批号分别为ab170941、ab9485）均购自英国Abcam公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗（批号SA00001-2）购自武汉三鹰生物技术有限公司；双萤光素酶报告基因检测试剂盒（批号E2920）购自美国Promega公司；敲减SLC25A25-AS1及其阴性对照慢病毒、过表达SLC25A25-AS1及其阴性对照慢病毒、miR-212-3p模拟物（miR-212-3p mimics）及其阴性对照（mimics NC）、SLC25A25-AS1野生型（SLC25A25-AS1-WT）及突变型（SLC25A25-AS1-MUT）质粒、PTEN野生型（PTEN-WT）及突变型（PTEN-MUT）质粒均由苏州吉玛基因股份有限公司提供或合成；RT-qPCR实验所用引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司设计并合成。

1.3 动物与细胞

本研究所用动物为15只SPF级雄性BALB/c裸鼠，体重21～25 g，购自辽宁长生生物技术股份有限公司，生产许可证号为SCXK（辽）2020-0001。所有裸鼠均饲养于中国医科大学实验动物中心（温度18～22 ℃，相对湿度50%～60%，每12 h明暗交替）。本研究方案通过牡丹江医学院实验动物福利伦理委员会批准（编号2023-MYG2R01）。

本研究所用细胞为人胃癌细胞MKN28（批号FT-Y1357），购自上海梵态生物科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

将MKN28细胞接种于含10%胎牛血清和1%青-链霉素双抗的RPMI-1640培养基中，于37 ℃、5%CO_2条件下培养。

2.2 裸鼠成瘤实验

裸鼠适应性饲养1周后，于左侧腋下注射1×10^7个MKN28细胞（用生理盐水重悬）以构建移植瘤模型。待瘤体生长至100 mm^3时，将裸鼠随机分为模型对照组和异鼠李素低、高剂量组，每组5只。异鼠李素低、高剂量组裸鼠分别腹腔注射20、40 mg/kg异鼠李素[给药方法及注射剂量参考相关文献[15]，以二甲基亚砜（DMSO）为溶剂]，模型对照组裸鼠腹腔注射等体积DMSO，每天1次，连续15 d。末次给药后，将裸鼠安乐死，取其瘤体并测定瘤体体积和质量。

2.3 MKN28细胞实验

2.3.1 异鼠李素处理浓度的确定

将MKN28细胞接种于96孔板中，培养过夜待贴壁后，加入0（对照）、5、10、20、40、80、160 μmol/L的异鼠李素，并设置不含细胞、不含药物的空白孔，每浓度设置3个复孔。继续培养24 h，弃去培养基，各孔加入CCK-8试剂10 μL，于37 ℃下孵育1 h后，使用酶标仪于450 nm波长下检测其吸光度值并计算细胞活力[细胞活力（%）=（实验孔吸光度值－空白孔吸光度值）/（对照孔吸光度值－空白孔吸光度值）×100%]，同时计算异鼠李素的半数抑制浓度（IC_{50}）。

2.3.2 细胞分组、处理及转染效果评价

将MKN28细胞分为对照组、异鼠李素组、异鼠李素+敲减阴性对照组、异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组、异鼠李素+过表达阴性对照组、异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组，每组设置3个复孔。除对照组加入等体积DMSO外，其余各组细胞均加入70 μmol/L的异鼠李素（浓度参考“2.3.1”项下IC_{50}值设置）；异鼠李素+敲减阴性对照组、异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组、异鼠李素+过表达阴性对照组和异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组则在加入异鼠李素前通过慢病毒转染建立稳定的敲减阴性对照、敲减SLC25A25-AS1、过表达阴性对照和过表达SLC25A25-AS1细胞。具体转染步骤如下：取对数生长期的细胞接种于6孔板中，待其汇合度达50%时分别加入敲减阴性对照、敲减SLC25A25-AS1、过表达对照和过表达SLC25A25-AS1慢病毒（感染复数为40，病毒滴度约为8×10^6 TU），继续培养24 h后，更换新鲜培养基；继续培养，待细胞汇合度达80%时用嘌呤霉素（1 μg/mL）筛选稳定转染的细胞，并通过RT-qPCR实验检测其SLC25A25-AS1的表达情况来判断转染是否成功。

RT-qPCR实验的具体操作如下：取上述各组细胞，弃去培养基，以磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤后，以RNAiso Plus提取试剂提取总RNA，按相应试剂盒说明书方法将其逆转录为cDNA，并以此为模板进行qPCR扩增。反应体系为TB Green Premix Ex Taq Ⅱ Fast qPCR试剂12.5 μL，正向、反向引物（引物序列及产物大小见表1）各1 μL，cDNA模板1 μL，灭菌水9.5 μL。反应条件为：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火/延伸10 s，共40个循环。分别以GAPDH（mRNA检测）或U6（miR检测）为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因的相对表达量，结果以对照组为参照进行归一化处理。

表1 引物序列和产物大小

目的基因	引物序列（5’→3’）	产物大小/bp
SLC25A25-AS1	正向：CCTGGATGTATGCCTCAC	199
	反向：GGAGAATCGCTTGAACCT	
PTEN	正向：CTATTCTAACACCTCACCATTG	264
	反向：CTCATTCAGACCTTCACATTC	
GAPDH	正向：TATGACAACAGCCTCAAGAT	104
	反向：AGTCCTTCCACGATACCA	
miR-212-3p	正向：GCGCGTAACAGTCTCCAGTC	65
	反向：AGTGCAGGGTCCGAGGTATT	
U6	正向：CGCTTCGGCAGCACATAT	100
	反向：AAATATGGAACGCTTCACGA	

2.3.3　细胞活力检测

采用CCK-8法检测。取对数生长期细胞，按5 000个/孔接种于6孔板中，按“2.3.2”项下方法分组、处理。分别于培养0、24、48 h时，按“2.3.1”项下方法检测并计算各组细胞活力。

2.3.4　细胞凋亡检测

采用流式细胞术检测。取对数生长期细胞，按2×10^6个/孔接种于6孔板中，按“2.3.2”项下方法分组、处理。培养48 h后，收集细胞，用PBS洗涤3次后重悬，加入Annexin Ⅴ/FITC试剂5 μL，吹打混匀，室温避光孵育30 min；加入碘化丙啶（PI）溶液5 μL，室温避光孵育5 min；用PBS洗涤后，使用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

2.3.5　细胞迁移和侵袭能力检测

采用Transwell实验检测。取对数生长期细胞，以不含血清的培养基重悬，制成2×10^5个/mL的单细胞悬液。取上述悬液0.1 mL，接种于不包被基质胶（检测细胞迁移能力）或包被基质胶（检测细胞侵袭能力）的Transwell小室上层；取含20%胎牛血清的培养基，置于小室下层。上室细胞按“2.3.2”项下方法分组、处理。培养48 h后，收集细胞，用PBS洗涤后置于4%多聚甲醛溶液中在室温下固定15 min；用PBS洗涤，以0.1%结晶紫染色液在室温下染色2 h；用PBS洗涤，以棉签擦去未迁移的细胞，使用光学显微镜观察各组细胞迁移和侵袭情况（迁移或侵袭细胞呈紫色）并拍照、计数。

2.3.6　细胞中miR-212-3p、PTEN表达检测

（1）miR-212-3p与SLC25A25-AS1、PTEN靶向关系验证：利用ENCORI在线数据库（https://rnasysu.com/encori）预测miR-212-3p与SLC25A25-AS1、PTEN的潜在结合位点。采用双萤光素酶报告基因实验进行靶向关系验证：构建含结合位点的野生型质粒载体（SLC25A25-AS1-WT和PTEN-WT）以及含突变结合位点的突变型质粒载体（SLC25A25-AS1-MUT和PTEN-MUT）。将上述野生型质粒载体和突变型质粒载体分别和miR-212-3p mimics或mimics NC共转染至MKN28细胞中，得SLC25A25-AS1-WT+mimics NC组、SLC25A25-AS1-WT+miR-212-3p mimics组、SLC25A25-AS1-MUT+mimics NC组、SLC25A25-AS1-MUT+miR-212-3p mimics组、PTEN-WT+mimics NC组、PTEN-WT+miR-212-3p mimics组、PTEN-MUT+mimics NC组和PTEN-MUT+miR-212-3p mimics组，每组设置3个复孔。培养24 h后，收集细胞，按照双萤光素酶报告基因检测试剂盒说明书方法使用酶标仪检测萤光素酶活性。

（2）miR-212-3p、PTEN mRNA及蛋白表达检测：取对数生长期细胞，按2×10^6个/孔接种于6孔板中，按“2.3.2”项下方法分组、处理。培养48 h后，收集细胞，采用RT-qPCR法检测其中miR-212-3p、PTEN mRNA的相对表达量，具体操作同“2.3.2”项。采用Western blot法检测PTEN蛋白的表达，具体操作如下：收集各组细胞，以RIPA裂解液裂解后，离心收集总蛋白；总蛋白以BCA法测定浓度后，进行变性处理。取变性蛋白适量，进行SDS-PAGE分离并以湿转法转移至聚偏二氟乙烯膜上，以5%脱脂牛奶封闭1 h；洗膜后，加入PTEN、GAPDH一抗（稀释比例分别为1∶2 000、1∶2 500），4 ℃孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释比例1∶5 000），室温孵育1 h；洗膜后，以ECL试剂显影后成像，以目的蛋白与内参（GAPDH）的灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量。

2.4　统计学方法

采用SPSS 20软件对数据进行统计分析。实验数据以$\bar{x}\pm s$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Tukey事后检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　裸鼠成瘤实验结果

与模型对照组比较，异鼠李素低、高剂量组裸鼠的瘤体体积及质量均显著降低（$P<0.05$），且异鼠李素高剂量组显著低于异鼠李素低剂量组（$P<0.05$）。结果见图1、表2。

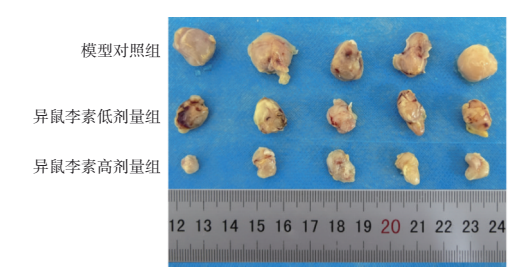


图1　各组移植瘤裸鼠瘤体观察图

表2　各组移植瘤裸鼠的瘤体体积及质量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	瘤体体积/mm^3	瘤体质量/g
模型对照组	1 195.02±231.72	0.89±0.18
异鼠李素低剂量组	819.53±127.66[a]	0.61±0.09[a]
异鼠李素高剂量组	389.19±163.99[ab]	0.30±0.11[ab]

a：与模型对照组比较，$P<0.05$；b：与异鼠李素低剂量组比较，$P<0.05$。

3.2　MKN28细胞实验结果

3.2.1　异鼠李素干预浓度筛选结果

与0 μmol/L异鼠李素组[（99.19±0.68）%]比较，5 μmol/L异鼠李素组细胞活力[（95.35±0.97）%]差异无统计学意义（$P>0.05$），而10、20、40、80、160 μmol/L异鼠李素组细胞活力[（88.78±1.05）%、（85.67±1.11）%、（62.48±1.14）%、（51.35±0.88）%、（18.97±1.07）%]均显著降低（$P<0.05$）；异鼠李素抑制胃癌细胞的IC_{50}值为67.11 μmol/L，遂以70 μmol/L作为后续实验的干预浓度。

3.2.2　转染效果评价

与对照组（1.02±0.05）比较，异鼠李素组、异鼠李素+敲减阴性对照组、异鼠李素+过表达阴性对照组细胞中SLC25A25-AS1的表达（4.23±0.37、4.15±0.32、4.09±0.38）均显著上调（$P<0.05$）；与异鼠李素组和异鼠李素+敲减阴性对照组比较，异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组细胞中SLC25A25-AS1的表达（1.82±0.13）显著下调（$P<0.05$）；与异鼠李素组和异鼠李素+过表达阴性对照组比较，异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组细胞中SLC25A25-AS1的表达（5.42±0.28）显著上调（$P<0.05$），提示转染成功。

3.2.3　敲减/过表达SLC25A25-AS1对异鼠李素处理胃癌细胞活力的影响

培养0 h时，各组细胞活力比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。细胞培养24、48 h时，与对照组比较，异鼠李素组、异鼠李素+敲减阴性对照组和异鼠李素+过表达阴性对照组细胞活力均显著降低（$P<0.05$）；与异鼠李素组和异鼠李素+敲减阴性对照组比较，异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组细胞活力显著升高（$P<0.05$）；与异鼠李素组和异鼠李素+过表达阴性对照组比较，异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组细胞活力显著降低（$P<0.05$）。结果见表3。

3.2.4　敲减/过表达SLC25A25-AS1对异鼠李素处理胃癌细胞凋亡的影响

与对照组[（2.46±0.26）%]比较，异鼠李素组、异鼠李素+敲减阴性对照组和异鼠李素+过表达阴性对照组细胞的凋亡率[（19.74±2.71）%、（18.85±2.14）%、（18.6±1.13）%]均显著升高（$P<0.05$）；与异鼠李素组和异鼠李素+敲减阴性对照组比较，异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组细胞的凋亡率[（11.43±1.52）%]显著降低（$P<0.05$）；与异鼠李素组和异鼠李素+过表达阴性对照组比较，异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组细胞的凋亡率[（23.99±0.46）%]显著升高（$P<0.05$）。结果见图2。

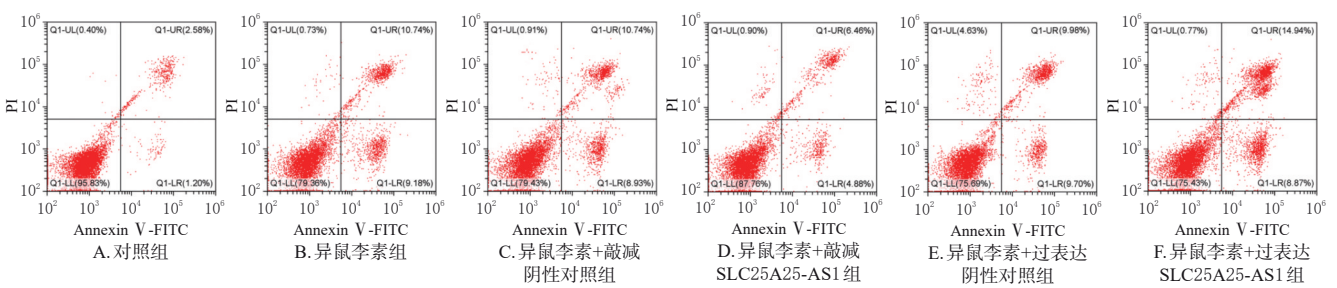
表3　各组MKN28细胞的活力比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，%）

组别	0 h	24 h	48 h
对照组	98.19±1.16	96.80±0.47	93.32±2.00
异鼠李素组	99.24±0.36	84.55±3.81[a]	66.63±4.04[a]
异鼠李素+敲减阴性对照组	99.24±0.36	83.90±5.02[a]	66.06±3.72[a]
异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组	98.80±1.04	93.03±2.99[bc]	83.47±4.33[bc]
异鼠李素+过表达阴性对照组	98.86±0.74	81.57±1.48[a]	65.80±4.63[a]
异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组	98.53±1.04	74.83±3.22[bd]	55.95±4.55[bd]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与异鼠李素组比较，$P<0.05$；c：与异鼠李素+敲减阴性对照组比较，$P<0.05$；d：与异鼠李素+过表达阴性对照组比较，$P<0.05$。

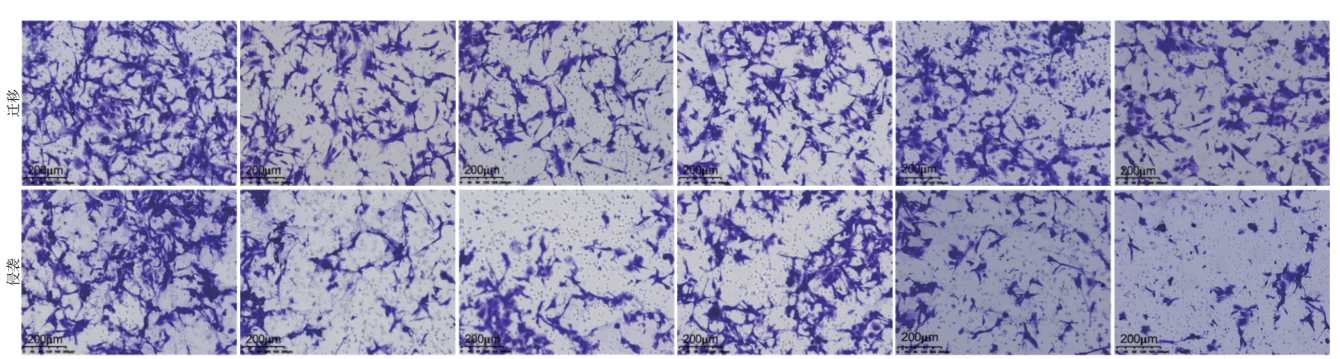
3.2.5　敲减/过表达SLC25A25-AS1对异鼠李素处理胃癌细胞迁移和侵袭能力的影响

与对照组比较，异鼠李素组、异鼠李素+敲减阴性对照组和异鼠李素+过表达阴性对照组的迁移、侵袭细胞数均显著减少（$P<0.05$）；与异鼠李素组和异鼠李素+敲减阴性对照组比较，异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组的迁移、侵袭细胞数均显著增多（$P<0.05$）；与异鼠李素组和异鼠李素+过表达阴性对照组比较，异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组的迁移、侵袭细胞数均显著减少（$P<0.05$）。结果见图3、表4。



A. 对照组　B. 异鼠李素组　C. 异鼠李素+敲减阴性对照组　D. 异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组　E. 异鼠李素+过表达阴性对照组　F. 异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组

图2　各组MKN28细胞凋亡情况的流式图



A. 对照组　B. 异鼠李素组　C. 异鼠李素+敲减阴性对照组　D. 异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组　E. 异鼠李素+过表达阴性对照组　F. 异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组

图3　各组MKN28细胞迁移和侵袭情况的显微图

表4　各组MKN28细胞的迁移和侵袭细胞数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，个）

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
对照组	244.00±7.94	228.67±12.20
异鼠李素组	84.00±8.00[a]	71.00±6.56[a]
异鼠李素+敲减阴性对照组	87.30±5.51[a]	65.67±5.51[a]
异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组	133.67±11.15[bc]	119.33±10.41[bc]
异鼠李素+过表达阴性对照组	85.52±6.89[a]	62.18±5.29[a]
异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组	68.82±4.28[bd]	47.92±4.25[bd]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与异鼠李素组比较，$P<0.05$；c：与异鼠李素+敲减阴性对照组比较，$P<0.05$；d：与异鼠李素+过表达阴性对照组比较，$P<0.05$。

3.2.6　SLC25A25-AS1/miR-212-3p/PTEN靶向关系及表达调节作用验证

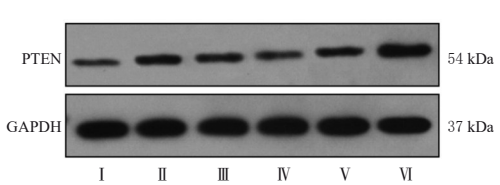
（1）miR-212-3p与SLC25A25-AS1、PTEN靶向关系验证结果：双萤光素酶报告基因实验结果（表5）显示，转染SLC25A25-AS1-WT或PTEN-WT后，与共转染mimics NC细胞比较，共转染miR-212-3p mimics细胞的萤光素酶活性均显著降低（$P<0.05$）；而转染SLC25A25-AS1-MUT或PTEN-MUT后，与共转染mimics NC细胞比较，共转染miR-212-3p mimics细胞的萤光素酶活性差异均无统计学意义（$P>0.05$），提示miR-212-3p与SLC25A25-AS1、PTEN存在靶向关系。

表5　双萤光素酶报告基因实验结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

共转染物	SLC25A25-AS1-WT	SLC25A25-AS1-MUT	PTEN-WT	PTEN-MUT
mimics NC	1.02±0.01	0.99±0.02	1.00±0.03	0.95±0.04
miR-212-3p mimics	0.42±0.05[a]	0.96±0.03	0.33±0.04[a]	0.96±0.06

a：与共转染mimics NC细胞比较，$P<0.05$。

（2）敲减/过表达SLC25A25-AS1对异鼠李素处理胃癌细胞中miR-212-3p、PTEN表达的影响：与对照组比较，异鼠李素组、异鼠李素+敲减阴性对照组和异鼠李素+过表达阴性对照组细胞中miR-212-3p的表达显著下调，PTEN mRNA及蛋白的表达均显著上调（$P<0.05$）；与异鼠李素组和异鼠李素+敲减阴性对照组比较，异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组细胞中miR-212-3p的表达显著上调，PTEN mRNA及蛋白的表达均显著下调（$P<0.05$）；与异鼠李素组和异鼠李素+过表达阴性对照组比较，异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组细胞中miR-212-3p的表达显著下调，PTEN mRNA及蛋白的表达均显著上调（$P<0.05$）。结果见图4、表6。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：异鼠李素组；Ⅲ：异鼠李素+敲减阴性对照组；Ⅳ：异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组；Ⅴ：异鼠李素+过表达阴性对照组；Ⅵ：异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组。

图4　各组MKN28细胞中PTEN蛋白表达的电泳图

表6　各组MKN28细胞中miR-212-3p、PTEN mRNA及蛋白表达的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	miR-212-3p	PTEN mRNA	PTEN蛋白
对照组	1.03±0.01	1.01±0.03	0.24±0.02
异鼠李素组	0.41±0.03[a]	3.68±0.35[a]	0.47±0.03[a]
异鼠李素+敲减阴性对照组	0.43±0.02[a]	3.57±0.49[a]	0.43±0.05[a]
异鼠李素+敲减SLC25A25-AS1组	0.73±0.04[bc]	2.11±0.85[bc]	0.36±0.03[bc]
异鼠李素+过表达阴性对照组	0.44±0.04[a]	3.51±0.28[a]	0.46±0.04[a]
异鼠李素+过表达SLC25A25-AS1组	0.19±0.02[bd]	4.38±0.52[bd]	0.76±0.07[bd]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与异鼠李素组比较，$P<0.05$；c：与异鼠李素+敲减阴性对照组比较，$P<0.05$；d：与异鼠李素+过表达阴性对照组比较，$P<0.05$。

4　讨论

尽管胃癌的早期检测和化疗已取得了很大进展，但在提高患者生存率方面仍收效甚微[3]。天然药物及其衍生物因疗效好且副作用小而在恶性肿瘤临床治疗领域表现出了巨大的潜力[4]。异鼠李素是槲皮素的3′-*O*-甲基化代谢产物，对多种恶性肿瘤细胞具有抑制活性[6]。研究表明，异鼠李素可通过线粒体依赖性凋亡、阻断磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路、抑制胞外信号调节激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路等途径来抑制胃癌的发展[16—17]。本研究结果显示，异鼠李素可抑制胃癌细胞移植瘤裸鼠体内肿瘤的生长，并可显著降低胃癌细胞的活力，与上述研究结果一致。此外，本研究还发现，异鼠李素可显著减弱胃癌细胞的迁移和侵袭能力，并增加细胞凋亡率，进一步证实了异鼠李素对胃癌发展的抑制作用。

lncRNA SLC25A25-AS1对非小细胞肺癌具有一定的促进作用，其表达沉默与非小细胞肺癌细胞增殖受阻、凋亡增加、迁移/侵袭减弱有关；进一步的机制研究显示，SLC25A25-AS1可通过海绵化miR-195-5p来上调其下游靶蛋白（整联蛋白α2）的表达，从而促进非小细胞肺癌的发展[9]。然而，SLC25A25-AS1对结直肠癌具有抑制作用，其过表达可抑制结直肠癌细胞的增殖和克隆形成，其表达下调可增强结直肠癌细胞化疗耐药性并促进上皮间质转化[10]。本研究前期基于生物信息学进行筛选发现，SLC25A25-AS1在异鼠李素处理的胃癌细胞中的表达有所上调[11]。本研究结果显示，经异鼠李素处理后，胃癌细胞中SLC25A25-AS1的表达显著上调，与前期生物信息学分析结果一致。本研究还检测了敲减/过表达SLC25A25-AS1对异鼠李素处理胃癌细胞活力、凋亡、迁移和侵袭的影响，结果显示，敲减SLC25A25-AS1可逆转异鼠李素对胃癌细胞活力、迁移、侵袭的抑制作用以及对细胞凋亡的促进作用，而过表达SLC25A25-AS1则可增强异鼠李素对胃癌细胞活力、迁移、侵袭的抑制作用以及对细胞凋亡的促进作用。这提示异鼠李素可能通过上调SLC25A25-AS1的表达来抑制胃癌的发展。

lncRNA常通过与miR下游靶基因竞争结合来上调该靶基因的表达，从而促进或抑制肿瘤的发展，如miR-212-3p在胃癌细胞中的表达明显上调，并可通过抑制沉默信息调节因子1的表达来促进胃癌细胞的体外增殖、迁移、侵袭和肿瘤的体内生长[13]。本研究通过双萤光素酶报告基因实验证实了SLC25A25-AS1与miR-212-3p的靶向结合关系，同时发现异鼠李素可显著下调胃癌细胞中miR-212-3p的表达，敲减SLC25A25-AS1可逆转异鼠李素对胃癌细胞中miR-212-3p表达的下调作用，而过表达SLC25A25-AS1则可增强异鼠李素对胃癌细胞中miR-212-3p表达的下调作用。PTEN为肿瘤抑制因子，是恶性肿瘤治疗的重要靶点，其表达缺失与肿瘤细胞增殖增加及肿瘤发生密切相关[18]。本研究通过双萤光素酶报告基因实验证实了PTEN与miR-212-3p的靶向结合关系。此外，本研究结果显示，异鼠李素可上调胃癌细胞中PTEN mRNA及蛋白的表达，敲减SLC25A25-AS1可逆转异鼠李素对胃癌细胞中PTEN mRNA及蛋白表达的上调作用，而过表达SLC25A25-AS1则可增强异鼠李素对胃癌细胞中PTEN mRNA及蛋白表达的上调作用。这提示异鼠李素抑制胃癌发展的作用可能是通过上调SLC25A25-AS1的表达、调节miR-212-3p/PTEN轴而实现的。

综上所述，异鼠李素可能通过上调SLC25A25-AS1表达、下调miR-212-3p并上调miR-212-3p下游靶点PTEN的表达，从而抑制胃癌的发展。

参考文献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] MACHLOWSKA J, BAJ J, SITARZ M, et al. Gastric cancer: epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): E4012.

[3] GUAN W L, HE Y, XU R H. Gastric cancer treatment: recent progress and future perspectives[J]. J Hematol Oncol, 2023, 16(1): 57.

[4] KÜPELI AKKOL E, BARDAKCI H, BARAK T H, et al. Herbal ingredients in the prevention of breast cancer: comprehensive review of potential molecular targets and role of natural products[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 6044640.

[5] GONG G, GUAN Y Y, ZHANG Z L, et al. Isorhamnetin: a review of pharmacological effects[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128: 110301.

[6] BISWAS P, ABU KAIUM M, ISLAM TAREQ M M, et al. The experimental significance of isorhamnetin as an effective therapeutic option for cancer: a comprehensive analysis[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 176: 116860.

[7] SMOLARZ B, ZADROŻNA-NOWAK A, ROMANOWICZ H. The role of lncRNA in the development of tumors, including breast cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8427.

[8] WEI L, SUN J J, ZHANG N S, et al. Noncoding RNAs in gastric cancer: implications for drug resistance[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 62.

[9] CHEN J, GAO C, ZHU W. Long non-coding RNA SLC25A25-AS1 exhibits oncogenic roles in non-small cell lung cancer by regulating the microRNA-195-5p/ITGA2 axis[J]. Oncol Lett, 2021, 22(1): 529.

[10] LI Y, HUANG S K, LI Y, et al. Decreased expression of lncRNA SLC25A25-AS1 promotes proliferation, chemoresistance, and EMT in colorectal cancer cells[J]. Tumor Biol, 2016, 37(10): 14205-14215.

[11] LI Y, FAN B, PU N, et al. Isorhamnetin suppresses human gastric cancer cell proliferation through mitochondria-dependent apoptosis[J]. Molecules, 2022, 27(16): 5191.

[12] KADIAN L K, VERMA D, LOHANI N, et al. Long non-coding RNAs in cancer: multifaceted roles and potential targets for immunotherapy[J]. Mol Cell Biochem, 2024, 479(12): 3229-3254.

[13] LI Q K, LIU Y K, LI J W, et al. Circ-SIRT1 inhibits growth and invasion of gastric cancer by sponging miR-132-3p/miR-212-3p and upregulating SIRT1 expression [J]. Neoplasma, 2021, 68(4): 780-787.

[14] GUAN C J, LUAN L Y, LI J, et al. miR-212-3p improves rat functional recovery and inhibits neurocyte apoptosis in spinal cord injury models via PTEN downregulation-mediated activation of AKT/mTOR pathway[J]. Brain Res, 2021, 1768: 147576.

[15] 冯希霞，迈宇鹤，穆宏. 异鼠李素介导miR-454-3p/PIK3R1轴对口腔鳞状细胞癌细胞生物学特性的影响[J]. 中医药导报，2024，30(4)：23-29.

[16] LI C, LI J, LI Y, et al. Isorhamnetin promotes MKN-45 gastric cancer cell apoptosis by inhibiting PI3K-mediated adaptive autophagy in a hypoxic environment[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(29): 8130-8143.

[17] SHI X F, YU Q, WANG K B, et al. Active ingredients isorhamnetin of Croci Srigma inhibit stomach adenocarcinomas progression by MAPK/mTOR signaling pathway [J]. Sci Rep, 2023, 13: 12607.

[18] ASHRAFIZADEH M, NAJAFI M, ANG H L, et al. PTEN, a barrier for proliferation and metastasis of gastric cancer cells: from molecular pathways to targeting and regulation[J]. Biomedicines, 2020, 8(8): E264.

（收稿日期：2024-09-30　修回日期：2025-02-21）
（编辑：张元媛）