

引用本文:田春阳,张萌,夏永欣,等.茶黄素通过上调环状RNA叉头框蛋白3表达调控结肠癌细胞增殖及凋亡[J].安徽医药,2022,26(7):1306-1310.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.07.008.



◇ 药学研究 ◇

# 茶黄素通过上调环状RNA叉头框蛋白3表达调控结肠癌细胞增殖及凋亡

田春阳,张萌,夏永欣,张向东

作者单位:南阳市中心医院消化科二病区,河南 南阳 473000

**摘要:** 目的 探讨茶黄素(TF)对结肠癌细胞增殖、凋亡的影响及其对环状RNA叉头框蛋白3(circ-Foxo3)的调控作用。方法 该研究于2018年10月至2019年12月进行,体外培养人结肠癌细胞HCT-8,分别使用不同剂量的TF处理细胞,分别将空载体(pcDNA)、过表达 circ-Foxo3(pcDNA-circ-Foxo3)转染至HCT-8细胞,分别将抑制物(si-NC)、抑制 circ-Foxo3(si-circ-Foxo3)转染至HCT-8细胞,随后加入TF处理细胞;采用噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖;流式细胞术检测细胞凋亡率;采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测 circ-Foxo3的表达量。结果 TF可明显降低细胞存活率[(100.00±0.12)%比(82.93±5.51)%、(56.67±12.36)%、(32.26±6.10)%、 $P<0.05$ ],提高凋亡率[(5.96±0.58)%比(13.67±1.67)%、(17.23±0.52)%、(21.49±2.00)%、 $P<0.05$ ],促进 circ-Foxo3的表达[(1.01±0.01)比(1.35±0.10)、(1.76±0.07)、(2.62±0.39)、 $P<0.05$ ];转染 pcDNA-circ-Foxo3可明显降低细胞存活率( $P<0.05$ ),提高凋亡率( $P<0.05$ );转染 si-circ-Foxo3可明显降低TF对HCT-8细胞增殖及凋亡的作用。结论 TF通过上调 circ-Foxo3表达抑制结肠癌细胞增殖及促进细胞凋亡。

**关键词:** 茶; 儿茶素; 多酚类; 茶黄素; circ-Foxo3; 结肠癌; 增殖; 凋亡

## Theaflavin regulates colon cancer cell proliferation and apoptosis by up-regulating circ-Foxo3 expression

TIAN Chunyang,ZHANG Meng,XIA Yongxin,ZHANG Xiangdong

Author Affiliation:Department of Second Ward of Digestive, Nanyang Central Hospital Nanyang, Nanyang, Henan 473000, China

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of theaflavin on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells and its regulation on circular RNA forkhead box protein 3 (circ-Foxo3). **Methods** This study started in October 2018 and December 2019, human colon cancer cells HCT-8 were cultured in vitro, cells were treated with different doses of theaflavins, respectively. and empty vector (pcDNA) and overexpression of circ-Foxo3 (pcDNA-circ-Foxo3) were transfected into HCT-8 cells, respectively. The inhibitor (si-NC) and inhibition of circ-Foxo3 (si-circ-Foxo3) were transfected into HCT-8 cells respectively, and then theaflavin was added to treat the cells. Thiazolyl Blue (MTT) method was used to detect cell proliferation. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate. The expression of circ-Foxo3 was detected by quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) method. **Results** Theaflavins significantly reduced the cell survival rate [(100.00±0.12)% vs. (82.93±5.51)%, (56.67±12.36)%, (32.26±6.10)%,  $P<0.05$ ], increased the apoptosis rate [(5.96±0.58)% vs. (13.67±1.67)%, (17.23±0.52)%, (21.49±2.00)%,  $P<0.05$ ], promoted the expression of circ-Foxo3 [(1.01±0.01) vs. (1.35±0.10), (1.76±0.07), (2.62±0.39),  $P<0.05$ ]. Transfection of pcDNA-circ-Foxo3 could significantly reduce cell survival rate ( $P<0.05$ ), increase apoptosis rate ( $P<0.05$ ). Transfection of si-circ-Foxo3 could significantly reduce the effect of theaflavins on the proliferation and apoptosis of HCT-8 cells. **Conclusion** Theaflavin inhibits the proliferation of colon cancer cells and promotes apoptosis by up-regulating circ-Foxo3 expression.

**Key words:** Teas; Catechin; Polyphenols; Theaflavin; Circ-Foxo3; Colon cancer; Proliferation; Apoptosis

结肠癌是临床常见的一种消化道恶性肿瘤,其常发生于大肠底部与直肠内,环境、遗传因素及基因改变均可能影响结肠癌发生及发展,目前临床主要采用手术与化疗等方式进行治疗,但术后病人易出现转移及复发等情况,近年来,结肠癌发病率逐年上升,已严重威胁人类生命安全,因而寻找有效的治疗方法成为研究重点<sup>[1-2]</sup>。中药具有毒副作用

小等特点,近年来,中药提取物在结肠癌等肿瘤治疗过程中发挥重要作用,但关于其作用机制仍未完全阐明<sup>[3-4]</sup>。茶叶具有抗癌等作用,其中茶黄素(TF)是其主要成分,并可抑制肿瘤细胞增殖及转移<sup>[5]</sup>。但TF对结肠癌的治疗效果及其作用机制尚未阐明。环状RNA-叉头框蛋白3(circ-Foxo3)在食管癌细胞中表达水平降低,可抑制细胞增殖及促进细胞凋

亡<sup>[6]</sup>。但 circ-Foxo3 是否可介导 TF 抗结肠癌的过程尚未可知。因此,2018年10月至2019年12月,本研究主要探讨 TF 是否可调控 circ-Foxo3 影响结肠癌细胞增殖及凋亡。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** TF 购自成都格纯生物医药有限公司;人结肠癌细胞 HCT-8 购自美国 ATCC 细胞库;Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司;抑制物 (si-NC)、抑制 circ-Foxo3 (si-circ-Foxo3) 购自广州锐博生物科技有限公司;空载体 (pcDNA)、过表达 circ-Foxo3 (pcDNA-circ-Foxo3) 购自武汉森灵生物科技有限公司;MTT、膜联蛋白 V-FITC/碘化丙啶 (Annexin V-FITC/PI) 法凋亡检测试剂盒购自美国 Sigma 公司;Trizol 试剂购自北京全式金生物技术有限公司;反转录与荧光定量检测试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司;兔抗人细胞核增殖抗原-67 (Ki-67)、增殖细胞核抗原 (PCNA)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、活化胱天蛋白酶 3 (cleaved caspase-3) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;HRP 标记的山羊抗兔二抗购自武汉艾美捷科技有限公司。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** HCT-8 细胞常规培养,取对数生长期 HCT-8 细胞接种于 96 孔板 ( $5 \times 10^3$  个/孔),分别加入不同浓度 (15  $\mu\text{mol/L}$ 、25  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ ) 的 TF 处理 24 h<sup>[7]</sup>,分别记作 TF-L 组、TF-M 组、TF-H 组。同时将正常培养的细胞作为 Con 组。按照 Lipofectamine2000 转染试剂说明书分别将 pcDNA、pcDNA-circ-Foxo3 转染至 HCT-8 细胞,分别记作 pcDNA 组、pcDNA-circ-Foxo3 组。分别将 si-NC、si-circ-Foxo3 转染至 HCT-8 细胞,加入含有浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  TF 的培养基处理 24 h,分别记作 TF-H+si-NC 组、TF-H+si-circ-Foxo3 组。

**1.2.2 MTT 法检测细胞增殖** 收集各组 HCT-8 细胞 ( $1 \times 10^5$  个/毫升) 接种于 96 孔板 (每孔 100  $\mu\text{L}$ ),每孔加入 MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ ,置于培养箱继续培养 4 h,弃上清,加入 DMSO (每孔 150  $\mu\text{L}$ ),室温震荡孵育 5 min,应用酶标仪检测各孔在波长为 490 nm 处的吸光度值。

**1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率** HCT-8 细胞加入预冷 PBS 洗涤后弃上清,加入 500  $\mu\text{L}$  结合缓冲液,参照凋亡检测试剂盒检测各组细胞凋亡率。

**1.2.4 qRT-PCR 检测细胞中 circ-Foxo3 的表达水平** 采用 Trizol 法提取 HCT-8 细胞总 RNA,参照反转录试剂盒合成互补 DNA (cDNA)。qRT-PCR 反应

与反应体系均按照试剂盒说明书操作并检测 circ-Foxo3 相对表达量。

**1.2.5 蛋白质印迹法检测 Ki-67、PCNA、Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达** 各组 HCT-8 细胞加入 400  $\mu\text{L}$  RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,SDS-PAGE 分离蛋白,转膜,封闭,分别加入一抗稀释液 (1:1 000) 与二抗稀释液 (1:2 000),室温孵育 1 h, TBST 洗涤,应用 ImageJ 软件分析各条带灰度值。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示且均符合正态分布,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,总体有差异进一步采用 SNK-*q* 检验进行两两比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

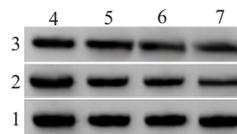
**2.1 TF 对结肠癌细胞 HCT-8 增殖的影响** 与 Con 组比较,TF-L 组、TF-M 组、TF-H 组细胞存活率及 Ki-67、PCNA 蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ ),且 TF-L 组、TF-M 组、TF-H 组各指标比较均差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 1,图 1。

表 1 茶黄素对结肠癌细胞 HCT-8 增殖的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	存活率/%	Ki-67	PCNA
Con	9	100.00±0.12	0.89±0.05	0.92±0.03
TF-L	9	82.93±5.51 <sup>①</sup>	0.70±0.05 <sup>①</sup>	0.77±0.05 <sup>①</sup>
TF-M	9	56.67±12.36 <sup>①②</sup>	0.51±0.03 <sup>①②</sup>	0.61±0.05 <sup>①②</sup>
TF-H	9	32.26±6.10 <sup>①②③</sup>	0.36±0.05 <sup>①②③</sup>	0.38±0.09 <sup>①②③</sup>
<i>F</i> 值		144.46	227.00	137.31
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:Ki-67 为细胞核增殖抗原-67,PCNA 为增殖细胞核抗原。

①与 Con 组比较, $P < 0.05$ 。②与 TF-L 组比较, $P < 0.05$ 。③与 TF-M 组比较, $P < 0.05$ 。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH);2—增殖细胞核抗原 (PCNA);3—细胞核增殖抗原-67 (Ki-67);4—对照组 (Con);5—低浓度茶黄素组 (TF-L);6—中浓度茶黄素组 (TF-M);7—高浓度茶黄素组 (TF-H)。

图 1 Western blotting 检测 Ki-67、PCNA 蛋白表达

**2.2 TF 对结肠癌细胞 HCT-8 凋亡及 circ-Foxo3 表达量的影响** 与 Con 组比较,TF-L 组、TF-M 组、TF-H 组凋亡率及 Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ ),Bcl-2 蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ ),且 TF-L 组、TF-M 组、TF-H 组各指标比较均差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 Con 组比较,TF-L 组、TF-M 组、TF-H 组 circ-Foxo3 的表达水平升高 ( $P < 0.05$ ),且 TF-L 组、TF-M 组、TF-H 组间 circ-Foxo3 的表达水平比较差异

有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2,图2。

**2.3 circ-Foxo3过表达对HCT-8细胞增殖及凋亡的影响** 与pcDNA组比较,pcDNA-circ-Foxo3组细胞存活率及Ki-67、PCNA、Bcl-2蛋白水平降低( $P < 0.05$ ),凋亡率及Bax、Cleaved Caspase-3蛋白水平升高( $P < 0.05$ ),见表3,图3。

**2.4 干扰circ-Foxo3表达可降低TF对HCT-8细胞增殖的作用** 与TF-H+si-NC组比较,TF-H+si-circ-Foxo3组细胞存活率及Ki-67、PCNA蛋白水平升高( $P < 0.05$ ),见表4。

**2.5 干扰circ-Foxo3表达可降低TF对HCT-8细胞凋亡的作用** 与TF-H+si-NC组比较,TF-H+si-circ-Foxo3组凋亡率及Bax、Cleaved Caspase-3蛋白水平降低( $P < 0.05$ ),Bcl-2蛋白水平升高( $P < 0.05$ ),见表5。

**3 讨论**

中药提取物可通过抑制结肠癌细胞增殖及转移从而发挥抗癌作用,但关于其作用机制尚未完全阐明,circRNA在结肠癌发生过程中表达异常并可

能通过调控细胞增殖、迁移及侵袭等生物学过程从而发挥作用,同时circRNA还可能作为结肠癌靶向治疗的潜在靶点<sup>[8-11]</sup>。

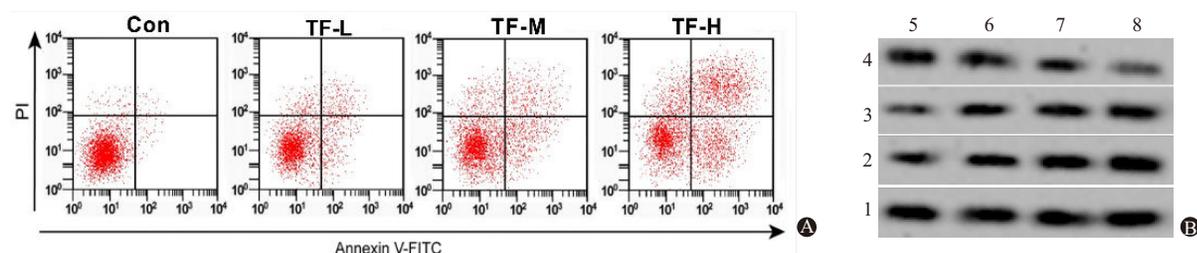
TF可抑制卵巢癌、卵巢癌干细胞增殖及转移<sup>[12-14]</sup>。红茶TF与茶红素还可抑制结肠癌、肺癌细胞增殖、迁移及侵袭<sup>[15]</sup>。与上述研究结果相似,本研究结果显示不同剂量的TF处理后结肠癌细胞存活率降低,凋亡率明显升高,且呈剂量依赖性,提示TF可抑制结肠癌细胞增殖及促进细胞凋亡。研究表明Ki-67、PCNA在肿瘤中表达水平升高,并可参与细胞周期过程从而促进细胞增殖<sup>[16]</sup>。Bcl-2表达上调可抑制细胞凋亡,Bax表达上调可促进线粒体释放细胞色素C而促进Caspase-3磷酸化形成Cleaved Caspase-3从而诱导细胞凋亡<sup>[17]</sup>。本研究结果显示不同剂量的TF处理后结肠癌细胞中Ki-67、PCNA、Bcl-2的表达水平降低,Bax、Cleaved Caspase-3的表达水平升高,且呈剂量依赖性,进一步证实TF可抑制结肠癌细胞增殖及诱导细胞凋亡从而发挥抗癌作用。

表2 茶黄素对结肠癌细胞HCT-8凋亡及circ-Foxo3表达量的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	凋亡率/%	Bcl-2	Bax	Cleaved Caspase-3	circ-Foxo3
Con	9	5.96±0.58	0.89±0.05	0.29±0.05	0.34±0.06	1.01±0.01
TF-L	9	13.67±1.67 <sup>①</sup>	0.69±0.05 <sup>①</sup>	0.52±0.04 <sup>①</sup>	0.53±0.06 <sup>①</sup>	1.35±0.10 <sup>①</sup>
TF-M	9	17.23±0.52 <sup>①②</sup>	0.51±0.07 <sup>①②</sup>	0.72±0.04 <sup>①②</sup>	0.72±0.04 <sup>①②</sup>	1.76±0.07 <sup>①②</sup>
TF-H	9	21.49±2.00 <sup>①②③</sup>	0.34±0.05 <sup>①②③</sup>	0.92±0.04 <sup>①②③</sup>	0.86±0.03 <sup>①②③</sup>	2.62±0.39 <sup>①②③</sup>
F值		210.78	162.27	359.47	190.36	103.96
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: Bcl-2为B细胞淋巴瘤/白血病-2, Bax为Bcl-2相关X蛋白, Cleaved Caspase-3为剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3, circ-Foxo3为环状RNA-叉头框蛋白3。

①与Con组比较,  $P < 0.05$ 。②与TF-L组比较,  $P < 0.05$ 。③与TF-M组比较,  $P < 0.05$ 。



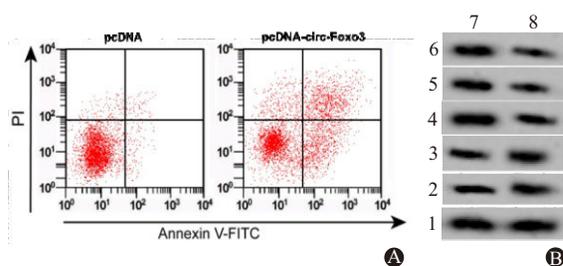
注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 2—剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Cleaved Caspase-3); 3—Bcl-2相关X蛋白(Bax); 4—B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2); 5—对照组(Con); 6—低浓度茶黄素组(TF-L); 7—中浓度茶黄素组(TF-M); 8—高浓度茶黄素组(TF-H)。

图2 茶黄素对结肠癌细胞HCT-8凋亡的影响:A为流式细胞术检测细胞凋亡率;B为Western blotting检测Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3蛋白表达

表3 circ-Foxo3过表达对HCT-8细胞增殖及凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	circ-Foxo3	存活率/%	Ki-67	PCNA	凋亡率/%	Bcl-2	Bax	Cleaved Caspase-3
pcDNA	9	1.00±0.01	98.76±2.34	0.90±0.05	0.92±0.05	5.95±0.31	0.90±0.05	0.29±0.06	0.33±0.06
pcDNA-circ-Foxo3	9	2.28±0.11	63.17±8.95	0.45±0.12	0.46±0.08	18.56±1.92	0.48±0.10	0.77±0.07	0.80±0.08
t值		34.77	11.54	10.39	14.63	19.45	11.27	15.62	14.10
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: pcDNA为空载体, pcDNA-circ-Foxo3为过表达circ-Foxo3, circ-Foxo3为环状RNA-叉头框蛋白3, Ki-67为细胞核增殖抗原-67, PCNA为增殖细胞核抗原, Bcl-2为B细胞淋巴瘤/白血病-2, Bax为Bcl-2相关X蛋白, Cleaved Caspase-3为剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Cleaved Caspase-3);3—Bcl-2相关X蛋白(Bax);4—B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2);5—增殖细胞核抗原(PCNA);6—细胞核增殖抗原-67(Ki-67);7—空载体(pcDNA);8—过表达 circ-Foxo3(pcDNA-circ-Foxo3)。

图3 circ-Foxo3过表达对HCT-8细胞增殖及凋亡的影响:A为流式细胞术检测细胞凋亡率;B为Western blotting检测Ki-67、PCNA、Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3蛋白表达

表4 干扰 circ-Foxo3 表达可降低茶黄素对 HCT-8 细胞增殖的作用/ $\bar{x} \pm s$

组别	circ-Foxo3	存活率/%	Ki-67	PCNA
TF-H+si-NC	1.00±0.01	32.18±7.93	0.37±0.05	0.37±0.03
TF-H+si-circ-Foxo3	0.31±0.04	92.15±5.92	0.79±0.06	0.86±0.06
t值	50.21	18.18	16.13	21.91
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:TF-H+si-NC为高浓度茶黄素+抑制物 si-NC,TF-H+si-circ-Foxo3为高浓度茶黄素+抑制物 circ-Foxo3,circ-Foxo3为环状RNA-叉头框蛋白3,Ki-67为细胞核增殖抗原-67,PCNA为增殖细胞核抗原。

表5 干扰 circ-Foxo3 表达可降低茶黄素对 HCT-8 细胞凋亡的作用/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	凋亡率/%	Bcl-2	Bax	Cleaved Caspase-3
TF-H+si-NC	9	21.24±1.17	0.34±0.07	0.92±0.05	0.85±0.05
TF-H+si-circ-Foxo3	9	13.57±1.94	0.77±0.06	0.45±0.13	0.41±0.12
t值		10.16	13.99	10.12	10.15
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:TF-H+si-NC为高浓度茶黄素+抑制物 si-NC,TF-H+si-circ-Foxo3为高浓度茶黄素+抑制物 circ-Foxo3,Bcl-2为B细胞淋巴瘤/白血病-2,Bax为Bcl-2相关X蛋白,Cleaved Caspase-3为剪切的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3。

circ-Foxo3在急性髓细胞性白血病中表达水平降低,并可能作用判断病人预后的辅助指标<sup>[18]</sup>。circ-Foxo3在食管鳞状细胞癌中表达水平降低,并可能通过调控miR-23a/PTEN分子轴从而抑制食管鳞状细胞癌的进展<sup>[19]</sup>。circ-Foxo3在尿路上皮癌中表达下调,并可能通过与miR-191-5p相互作用而诱导尿路上皮癌细胞凋亡<sup>[20]</sup>。本研究结果显示不同剂量的TF处理后结肠癌细胞中circ-Foxo3的表达水平升高,且随着药物剂量的增加而显著升高,提示TF可能通过上调circ-Foxo3的表达从而发挥抗结肠癌

作用。本研究进一步分析显示 circ-Foxo3 过表达后结肠癌细胞存活率降低,凋亡率升高,并可抑制 Ki-67、PCNA、Bcl-2 的表达及促进 Bax、Cleaved Caspase-3 的表达,提示 circ-Foxo3 过表达可抑制结肠癌细胞增殖及促进细胞凋亡。为探究 TF 是否可通过调控 circ-Foxo3 的表达从而影响结肠癌细胞增殖及凋亡,本研究将 si-circ-Foxo3 转染至结肠癌细胞,使用 TF 处理细胞,结果显示细胞增殖能力明显增强,凋亡率明显降低,提示干扰 circ-Foxo3 表达可降低 TF 对结肠癌细胞增殖及凋亡的作用。

综上所述,TF可抑制结肠癌细胞增殖及促进细胞凋亡,其作用机制可能与上调 circ-Foxo3 的表达有关,circ-Foxo3 可能作为结肠癌靶向治疗的潜在靶点,还可进一步揭示 TF 抗结肠癌的分子机制。

## 参考文献

- [1] 房祥杰,张彬,张德重,等. 迷迭香酸通过 MAPK/ERK 信号通路对结肠癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国肿瘤, 2018, 27(4): 306-310.
- [2] 赵慧巧,王雅莉,寇亮,等. 湿生扁蕾对结肠癌细胞 SW480 增殖的抑制作用及对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响[J]. 甘肃科技, 2018, 34(23): 97-100.
- [3] 李悠然,竺平,王浩,等. 藤黄醇提取物抑制人结肠癌细胞 HCT116 侵袭的分子机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(3): 581-585.
- [4] 罗吉,罗燕,李勇敏,等. 健脾消癌方对结肠癌 TGF- $\beta$ /In-cRNA-ATB/miR-200a 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 161-166.
- [5] 刘丽萍,吴宏文,王胜. 茶黄素对人宫颈癌细胞株 HeLa 顺铂敏感性的影响及其机制[J]. 山东医药, 2018, 58(19): 5-8.
- [6] 邢瑶,查文娟,李晓敏,等. 环状 RNA circ-Foxo3 模拟物转染对人食管癌细胞株 TE-13 增殖、凋亡、放射敏感性的影响[J]. 山东医药, 2020, 60(3): 17-20.
- [7] 黄夏宁. 茶黄素对鼻咽癌细胞的生物学影响及其机制研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2019: 1-95.
- [8] 戴国梁,贡涛,李豫,等. 五味子乙素通过 VEGF/PI3K/Akt 信号通路抑制人结肠癌细胞 SW620 的增殖和迁移[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(14): 1186-1191.
- [9] 方慧瑾,李燕,吴巍,等. 夏至草乙醇提取物对人结肠癌 HCT-116 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(22): 84-86.
- [10] HE JH, LI YG, HAN ZP, et al. The circRNA-ACAP2/Hsa-miR-21-5p/ tiam1 regulatory feedback circuit affects the proliferation, migration, and invasion of colon cancer SW480 cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(4): 1539-1550.
- [11] 张浩然,王搏,申占龙,等. 环状 RNA 的功能及其在结肠癌中的研究进展[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(2): 382-386.
- [12] 陈晓晶,朱晋伟,张晨,等. 茶黄素抗肿瘤作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43: 1-9. DOI: 10.13386/j. issn1002-0306.2021060134.
- [13] 潘海波. 茶黄素的 UPLC 分析及其对人卵巢癌细胞抑制作用和机制的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2018.

- [14] PAN H, KIM E, RANKIN GO, et al. Theaflavin-3, 3'-digallate inhibits ovarian cancer stem cells via suppressing Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway[J]. J Funct Foods, 2018, 50(1): 1-7.
- [15] IMRAN A, BUTT MS, XIAO H, et al. Inhibitory effect of black tea (Camellia sinensis) theaflavins and thearubigins against HCT 116 colon cancer cells and HT 460 lung cancer cells[J/OL]. J Food Biochem, 2019, 43(5): e12822-e12832.DOI: 10.1111/jfbc.12822.
- [16] WANG F, ZHU W, YANG R, et al. LncRNA ZEB2-AS1 contributes to the tumorigenesis of gastric cancer via activating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. Mol Cell Biochem, 2019, 456(1/2): 73-83.
- [17] GU YY, CHEN MH, MAY BH, et al. Matrine induces apoptosis in multiple colorectal cancer cell lines in vitro and inhibits tumour growth with minimum side effects in vivo via Bcl-2 and caspase-3 [J]. Phytomedicine, 2018, 51(1): 214-225.
- [18] ZHOU J, ZHOU LY, TANG X, et al. Circ-Foxo3 is positively associated with the Foxo3 gene and leads to better prognosis of acute myeloid leukemia patients [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 930-940.
- [19] XING Y, ZHA WJ, LI XM, et al. Circular RNA circ-Foxo3 inhibits esophageal squamous cell cancer progression via the miR-23a/PTEEN axis[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(3): 2595-2605.
- [20] WANG C, TAO W, NI S, et al. Circular RNA circ-Foxo3 induced cell apoptosis in urothelial carcinoma via interaction with miR-191-5p[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12(1): 8085-8094.

(收稿日期:2020-10-10,修回日期:2022-05-23)

引用本文:孙利平,宋亚玲,李春艳.阿米卡星调控微小RNA-223对脂多糖诱导的肺泡上皮细胞凋亡以及肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素6表达的影响[J].安徽医药,2022,26(7):1310-1314.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.07.009.



◇ 药学研究 ◇

## 阿米卡星调控微小RNA-223对脂多糖诱导的肺泡上皮细胞凋亡以及肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素6表达的影响

孙利平,宋亚玲,李春艳

作者单位:枣庄矿业集团中心医院儿科,山东 枣庄 277000

通信作者:李春艳,女,主任医师,研究方向为新生儿疾病,Email:zf4ysy@163.com

**摘要:** 目的 探讨阿米卡星对脂多糖(LPS)诱导的肺泡上皮细胞凋亡以及肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-6表达的影响和分子机制。方法 该研究于2020年1—7月完成,采用LPS诱导肺泡上皮细胞,构建急性肺损伤细胞模型。将肺泡上皮细胞分为对照组、模型组(LPS处理24 h)、实验组(由LPS和不同剂量的阿米卡星处理24 h)、anti-miR-NC组(转染微小RNA阴性对照后进行LPS处理)、anti-miR-223组(转染微小RNA-223抑制剂后进行LPS处理)、实验3+miR-NC组(转染微小RNA阴性对照后进行LPS和15  $\mu$ g/L阿米卡星处理)、实验3+miR-223组(转染微小RNA-223激动剂后进行LPS和15  $\mu$ g/L阿米卡星处理)。流式细胞术检测细胞凋亡;蛋白质印迹法(Western blotting)检测兔源裂解的胱天蛋白酶3(caspase3)表达。酶联免疫吸附测定(ELISA)检测细胞上清液中TNF- $\alpha$ 和IL-6含量。实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测miR-223(微小RNA-223)表达。结果 与对照组比较,模型组肺泡上皮细胞凋亡率(25.81 $\pm$ 1.82)%、caspase3(0.81 $\pm$ 0.06)和miR-223表达(0.17 $\pm$ 0.02)、细胞上清液中TNF- $\alpha$ (793.92 $\pm$ 34.49)ng/L和IL-6含量(412.04 $\pm$ 23.94)ng/L升高( $P$ <0.05)。与模型组比较,实验组肺泡上皮细胞凋亡率(22.07 $\pm$ 1.69)%、caspase3(0.68 $\pm$ 0.05)和miR-223表达(0.28 $\pm$ 0.03)、细胞上清液中TNF- $\alpha$ (478.38 $\pm$ 25.85)ng/L和IL-6含量(202.95 $\pm$ 15.55)ng/L降低( $P$ <0.05)。与anti-miR-NC组比较,anti-miR-223组肺泡上皮细胞凋亡率(10.12 $\pm$ 1.13)%、caspase3(0.27 $\pm$ 0.03)和miR-223表达(1.69 $\pm$ 0.08)、细胞上清液中TNF- $\alpha$ (403.48 $\pm$ 29.94)ng/L和IL-6含量(166.35 $\pm$ 15.61)ng/L降低( $P$ <0.05)。与实验3+miR-NC组比较,实验3+miR-223组肺泡上皮细胞凋亡率(24.03 $\pm$ 1.64)%、caspase3(0.75 $\pm$ 0.06)和miR-223表达(4.67 $\pm$ 0.22)、细胞上清液中TNF- $\alpha$ (726.18 $\pm$ 33.57)ng/L和IL-6含量(385.07 $\pm$ 22.15)ng/L升高( $P$ <0.05)。结论 阿米卡星对LPS诱导的肺泡上皮细胞具有明显的抗炎和抗凋亡作用,其机制可能与抑制miR-223表达有关。

**关键词:** 阿米卡星; 微小RNA-223; 肺泡上皮细胞; 细胞凋亡; 炎症反应; 急性肺损伤

### Effects of amikacin on apoptosis, TNF- $\alpha$ and IL-6 expression of effects of amikacin on LPS-induced apoptosis of alveolar epithelial cells and the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ and interleukin-6 by regulating miR-223

SUN Liping, SONG Yaling, LI Chunyan

Author Affiliation: Department of Pediatrics, Central Hospital of Zaozhuang Mining Group, Zaozhuang, Shandong 277000, China