

引用本文:蒋学军,杨勇,庾磊,等.艾叶乙酸乙酯提取物通过LINC01606/微小RNA-26b对结直肠癌细胞增殖、凋亡的影响[J].安徽医药,2022,26(9):1719-1723.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.09.006.

◇ 药学研究 ◇



艾叶乙酸乙酯提取物通过LINC01606/微小RNA-26b对结直肠癌细胞增殖、凋亡的影响

蒋学军,杨勇,庾磊,吉祖进,雷新益

作者单位:湖北医药学院附属国药东风总医院结直肠肛门外科,湖北 十堰 442000

摘要: **目的** 研究艾叶乙酸乙酯提取物对结直肠癌SW1116细胞增殖和凋亡的影响及其潜在的分子机制。**方法** 2018年6月至2019年11月,用12.5 mg/L、25 mg/L、50 mg/L的艾叶乙酸乙酯提取物处理结直肠癌细胞SW1116,分别称为实验1、2、3组,人胆囊收缩素/缩胆囊素八肽(CCK-8)法、流式细胞术和克隆形成实验检测SW1116细胞存活率、凋亡率、细胞周期和克隆形成能力,蛋白质印迹法检测周期素依赖激酶抑制剂p21(P21)和胱天蛋白酶-3(caspase-3)蛋白表达水平,实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测细胞中LINC01606和微小RNA(miR)-26b的转录水平,双荧光素酶报告系统验证LINC01606和miR-26b的关系。**结果** 实验1、2、3组的SW1116细胞克隆形成数(101 ± 9 、 79 ± 8 、 56 ± 6)、存活率[(81.57 ± 8.02)%、(68.17 ± 6.69)%、(48.26 ± 4.91)%]、S期细胞百分比[(31.98 ± 2.39)%、(26.10 ± 2.21)%、(23.21 ± 2.04)%]及细胞中LINC01606含量(0.76 ± 0.05 、 0.51 ± 0.05 、 0.34 ± 0.04)逐渐降低($P < 0.05$),P21(0.34 ± 0.03 、 0.47 ± 0.04 、 0.67 ± 0.05)、caspase-3(0.26 ± 0.02 、 0.38 ± 0.03 、 0.59 ± 0.04)蛋白表达量、miR-26b含量(1.26 ± 0.09 、 1.41 ± 0.10 、 1.69 ± 0.12)、细胞凋亡率[(13.37 ± 1.21)%、(17.94 ± 1.47)%、(24.36 ± 1.69)%]和G1期细胞百分比[(32.17 ± 2.41)%、(37.04 ± 2.75)%、(41.20 ± 3.24)%]均逐渐升高($P < 0.05$),呈显著剂量依赖趋势,剂量越高效果越显著;过表达LINC01606和抑制miR-26b均可提高细胞克隆形成数、存活率和S期细胞百分比,降低P21、caspase-3蛋白表达量、细胞凋亡率及G1期细胞百分比;LINC01606靶向调控miR-26b。**结论** 艾叶乙酸乙酯提取物通过LINC01606/miR-26b途径抑制SW1116细胞的增殖,促进细胞凋亡。艾叶乙酸乙酯提取物对结直肠癌具有潜在治疗作用。

关键词: 艾叶乙酸乙酯提取物; 结直肠肿瘤; 长链非编码RNA LINC01606; 增殖; 凋亡

Effects of ethyl acetate extract of *Folium Artemisiae Argyi* on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells through LINC01606/miR-26b

JIANG Xuejun, YANG Yong, TUO Lei, JI Zujin, LEI Xinyi

Author Affiliation: Department of Colorectal and Anal Surgery, Dongfeng General Hospital of Sinopharm, Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China

Abstract: **Objective** To study the effect of ethyl acetate extract of *Folium Artemisiae Argyi* on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer SW1116 cells and its underlying molecular mechanism. **Methods** From June 2018 to November 2019, SW1116 colorectal cancer cells were treated with 12.5 mg/L, 25 mg/L and 50 mg/L ethyl acetate extracts from *Folium Artemisiae Argyi*, referred to as experiments 1, 2, and 3, respectively. The human cholecystokinin/cholecystokinin octapeptide (CCK-8) method, flow cytometry and colony formation assays were used to detect the survival rate, apoptosis rate, cell cycle and colony formation ability of SW1116 cells. Western blotting was used to detect the levels of P21 and caspase-3 proteins, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the levels of long noncoding RNA LINC01606 and microRNA (miR)-26b, and a dual-luciferase reporter system was used to verify the relationship between LINC01606 and miR-26b. **Results** The number of colonies of SW1116 cells in experimental groups 1, 2 and 3 (101 ± 9 , 79 ± 8 , 56 ± 6), survival rate [(81.57 ± 8.02)%, (68.17 ± 6.69)%, (48.26 ± 4.91)%], percentage of cells in S phase [(31.98 ± 2.39)%, (26.10 ± 2.21)%, (23.21 ± 2.04)%], and LINC01606 content in cells (0.76 ± 0.05 , 0.51 ± 0.05 , 0.34 ± 0.04) gradually decreased ($P < 0.05$). The P21 (0.34 ± 0.03 , 0.47 ± 0.04 , 0.67 ± 0.05), caspase 3 (0.26 ± 0.02 , 0.38 ± 0.03 , 0.59 ± 0.04) proteins, miR-26b content (1.26 ± 0.09 , 1.41 ± 0.10 , 1.69 ± 0.12), apoptosis rate [(13.37 ± 1.21)%, (17.94 ± 1.47)%, (24.36 ± 1.69)%] and percentage of cells in G1-phase [(32.17 ± 2.41)%, (37.04 ± 2.75)%, (41.20 ± 3.24)%] gradually increased ($P < 0.05$), showing a significant dose-dependent trend, and the higher the dose, the more significant the effect. Overexpression of LINC01606 and inhibition of miR-26b can both increase the number of cell clones and survival. The percentage of cells in S phase and the P21 and caspase-3 protein expression, apoptosis rate and percentage of cells in G1 phase were reduced. LINC01606 targets and regulates miR-26b. **Conclusion** The ethyl acetate extract of *Folium Artemisiae Argyi* inhibits the proliferation of SW1116 cells and promotes cell apoptosis through the LINC01606/miR-26b pathway, which indicates a potential therapeutic effect on colorectal cancer.

Key words: Ethyl acetate extract of *Folium Artemisiae Argyi*; Colorectal neoplasms; Long noncoding RNA LINC01606; Proliferation; Apoptosis

中药在癌症的治疗中越来越多地发挥作用,研究表明,中药联合化疗在结直肠癌的治疗中发挥良好的效果,中药可提高病人免疫力,抑制癌细胞的增殖,对延长病人生存期、提高病人生存质量起一定的作用^[1-2]。

艾叶为菊科蒿属植物艾的叶子^[3]。研究发现,艾叶提取物对肝癌、胃癌、宫颈癌具有一定的抑制作用,且其呈明显的剂量依赖^[4-5],但艾叶提取物对结直肠癌的影响及其机制目前还不清楚。研究表明,微小RNA(miR)-26b在人结直肠癌组织和耐药细胞株 HT-29/5-氟尿嘧啶(5-FU)和 LOVO/5-FU 细胞中表达水平下调,且 miR-26b 在体外可提高结直肠癌细胞对 5-FU 的敏感性,在体内增强了 5-FU 对肿瘤生长的抑制作用^[6]。而本研究通过预测发现, LINC01606 与 miR-26b 之间存在结合位点。LINC01606 在胃癌中高表达,与胃癌细胞迁移、侵袭有关^[7],在结直肠癌中的表达和转移尚不清楚。基于以上研究和预测结果,本研究于 2018 年 6 月至 2019 年 11 月以人结直肠癌细胞系 SW1116 为研究对象,假设艾叶乙酸乙酯提取物通过调控 LINC01606/miR-26b 途径影响结直肠癌细胞的增殖和凋亡,并对其进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料 人结直肠癌细胞系 SW1116 购自美国模式菌种收集中心(ATCC);艾叶药材来自湖北医药学院附属国药东风总医院中药房,经中药师鉴定为菊科植物艾的干燥叶;胰蛋白酶购自美国 Sigma-Aldrich 公司;Transwell 板购自美国 Corning 公司;Lipofectamine 2000 转染试剂、RNA 提取试剂 Trizol、Real-time PCR 试剂盒、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;DMEM 高糖培养基和胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;流式法细胞凋亡检测试剂盒和人胆囊收缩素/缩胆囊素八肽(CCK-8)检测试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司;LINC01606 过表达载体(pcDNA3.1-LINC01606)、LINC01606 抑制物(si-LINC01606)、miR-26b 模拟物(miR-26b)、miR-26b 抑制物(anti-miR-26b)、空载体(pcDNA3.1)及阴性对照(miR-NC、anti-miR-NC、si-NC)购自苏州吉玛基因;周期素依赖激酶抑制剂 p21(P21)、胱天蛋白酶-3(caspase-3)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体购自英国 Abcam;流式细胞仪购自美国 BD 公司;Real-time PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和药物处理 细胞培养:在含 1% 青-链霉素、10%FBS 的 DMEM 高糖培养基中培养 SW1116 细胞,置于 5% 二氧化碳、37 °C 培养箱中培养至对数生长期,胰蛋白酶消化传代。药物处理:艾叶乙酸乙酯提取物采用文献[8]方法提取和制备。细胞过夜培养至贴壁状态时弃去培养液,加入含艾叶乙酸乙酯提取物 12.5 mg/L、25 mg/L、50 mg/L 浓度的 DMEM 高糖培养液,分别称为实验 1、2、3 组,培养 48 h,根据结果选择最佳处理浓度。

1.2.2 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 LINC01606 和 miR-26b 的表达 收集实验 1、2、3 组的 SW1116 细胞,Trizol 试剂提取细胞总 RNA,逆转录合成互补 DNA(cDNA),按 Real-time PCR 说明书合成 LINC01606 和 miR-26b,95 °C 1 min;94 °C 30 s、59 °C 40 s、72 °C 42 s,35 个循环;72 °C 5 min。LINC01606 正向引物:5'-GCTGGACATTTCTCCTTCA-3',反向引物:5'-GAGTCCTCTCGCTTCCTCT-3';GAPDH 正向引物:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',反向引物:5'-ATGGTGTTGAAGACGCCAGT-3';miR-26b 正向引物:5'-CCCAAGCTTAAAAACCTCCACCACGAAT-3',反向引物:5'-ACACTCCAGCTGGGTTCAGTAATTCAGG-3';U6 正向引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3',反向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3';运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析。

1.2.3 细胞转染 取对数生长期的 SW1116 细胞用培养液稀释为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个细胞/毫升,接种于 6 孔板(每孔 200 μ L 细胞)中培养。细胞融合度达到 80% 时,按照转染试剂说明书操作。将转染分组:LINC01606 过表达组(转染 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-LINC01606),LINC01606 抑制+药物组(转染 si-NC 和 si-LINC01606,然后用 10 mg/L 艾叶乙酸乙酯提取物处理 48 h)。转染 48 h,收集细胞。

1.2.4 CCK-8 实验检测细胞增殖 将 SW1116 细胞以 5×10^3 个/孔(100 μ L)接种于 96 微孔板中,培养 24 h 至贴壁后,换培养液,加入含艾叶乙酸乙酯提取物 12.5 mg/L、25 mg/L、50 mg/L 浓度的 DMEM 高糖培养液继续培养 48 h,每孔加入 100 μ L CCK-8 溶液,培养 2 h,酶标仪测定 450 nm 吸光度,细胞存活率% = 实验组吸光度/对照组吸光度 $\times 100\%$ 。

1.2.5 流式细胞术测定细胞凋亡率 收集各组 SW1116 细胞并稀释,以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板

中,过夜贴壁后换为含艾叶乙酸乙酯提取物 12.5、25、50 mg/L 浓度的 DMEM 高糖培养液继续培养 48 h,收集细胞用胰蛋白酶消化后依据凋亡试剂盒说明书操作。加入 5 μ L 标记的膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC) 和 5 μ L 碘化丙啶 (PI) 混匀,室温避光孵育 20 min,加入缓冲液,流式细胞仪检测凋亡率。

1.2.6 蛋白质印迹法 用放射免疫沉淀法 (RIPA) 裂解液裂解各组 SW1116 细胞并超声破碎,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),转膜,封闭 1 h。加入稀释的一抗 (P21 抗体 1:2 000、caspase-3 抗体 1:2 000 和 GAPDH 抗体 1:4 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。等渗缓冲盐溶液 (TBST) 洗膜 3 次,然后加入稀释的酶标二抗,室温孵育 2 h。以 GAPDH 为内参照,分析蛋白水平。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验 按照“1.2.3”的方法要求培养 SW1116 细胞,将构建的 lncRNA LINC01606 野生型 (WT-LINC01606) 和突变型 (MUT-LINC01606) 双荧光素酶报告载体,分别与 miR-NC 或 miR-26b 共转染 SW1116 细胞,转染 48 h 后裂解细胞。以海肾荧光素酶活性为内参照,检测并计算裂解后的上清中相对萤火虫荧光素酶活性。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用两独立样本 *t* 检验比较两组间数据差异,采用单因素方差分析比较多组间数据差异,采用 SNK-*q* 检验进行多组间的两两比较, $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 艾叶乙酸乙酯提取物对结直肠癌细胞 SW1116 增殖和凋亡的影响 与对照组相比,实验 1、2、3 组的 SW1116 细胞克隆形成数、存活率和 S 期细胞百分比逐渐降低 ($P < 0.05$),P21、caspase-3 蛋白表达量、细胞凋亡率及 G1 期细胞百分比均逐渐升高 ($P < 0.05$),呈显著剂量依赖趋势,剂量越高效果越显著,见表 1。说明艾叶乙酸乙酯提取物可抑制 SW1116 细胞增殖,促进细胞凋亡。

2.2 艾叶乙酸乙酯提取物对细胞 SW1116 中 LINC01606、miR-26b 表达的影响 与对照组相比,实验 1、2、3 组的 SW1116 细胞中 LINC01606 含量逐渐降低 ($P < 0.05$),miR-26b 逐渐升高 ($P < 0.05$),呈显著剂量依赖趋势,剂量越高效果越显著,见表 2。选用实验 3 组抑制率约为 50% 的艾叶乙酸乙酯提取物浓度 (50 mg/L) 进行后续实验。

表 2 艾叶乙酸乙酯提取物对细胞 SW1116 中 LINC01606、miR-26b 表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	LINC01606	miR-26b
对照组	3	1.01 $\pm$ 0.06	0.98 $\pm$ 0.08
实验 1 组	3	0.76 $\pm$ 0.05 ^①	1.26 $\pm$ 0.09 ^①
实验 2 组	3	0.51 $\pm$ 0.05 ^①	1.41 $\pm$ 0.10 ^①
实验 3 组	3	0.34 $\pm$ 0.04 ^①	1.69 $\pm$ 0.12 ^①
F 值		100.90	27.08
P 值		<0.001	<0.001

注:①与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 过表达 LINC01606 能逆转艾叶乙酸乙酯提取物对细胞 SW1116 增殖、凋亡的影响 转染 pcDNA-LINC01606 以实现过表达 LINC01606,与对照实验 3 组+pcDNA3.1 组相比,实验 3 组+pcDNA3.1-LINC01606 组 SW1116 细胞中 LINC01606 含量显著升高,细胞克隆形成数、存活率和 S 期细胞百分比均升高 ($P < 0.05$),P21、caspase-3 蛋白表达量、细胞凋亡率及 G1 期细胞百分比均降低 ($P < 0.05$)。见图 1,表 3。说明过表达 LINC01606 可逆转艾叶乙酸乙酯提取物对 SW1116 细胞增殖和凋亡的影响。

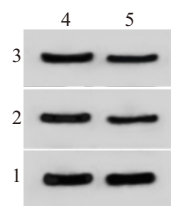
2.4 抑制 miR-26b 能逆转艾叶乙酸乙酯提取物对细胞 SW1116 增殖、凋亡的影响 与对照实验 3 组+pcDNA3.1 组相比,实验 3 组+pcDNA3.1-LINC01606 组 SW1116 细胞中 miR-26b 含量显著降低 ($P < 0.05$),细胞克隆形成数、存活率和 S 期细胞百分比均升高 ($P < 0.05$),P21、caspase-3 蛋白表达量、细胞凋亡率及 G1 期细胞百分比均降低 ($P < 0.05$),见图 2,表 4。说明抑制 miR-26b 可逆转艾叶乙酸乙酯提取物对 SW1116 细胞增殖和凋亡的影响。

表 1 艾叶乙酸乙酯提取物对细胞 SW1116 增殖、凋亡及细胞周期的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	P21	caspase-3	克隆形成数	存活率/%	凋亡率/%	G1/%	S/%	M/%
对照组	3	0.22 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.02	120 $\pm$ 10	100.01 $\pm$ 9.68	8.19 $\pm$ 0.93	28.69 $\pm$ 2.33	35.18 $\pm$ 2.56	36.13 $\pm$ 2.74
实验 1 组	3	0.34 $\pm$ 0.03 ^①	0.26 $\pm$ 0.02 ^①	101 $\pm$ 9 ^①	81.57 $\pm$ 8.02 ^①	13.37 $\pm$ 1.21 ^①	32.17 $\pm$ 2.41 ^①	31.98 $\pm$ 2.39 ^①	35.85 $\pm$ 2.62
实验 2 组	3	0.47 $\pm$ 0.04 ^①	0.38 $\pm$ 0.03 ^①	79 $\pm$ 8 ^①	68.17 $\pm$ 6.69 ^①	17.94 $\pm$ 1.47 ^①	37.04 $\pm$ 2.75 ^①	26.10 $\pm$ 2.21 ^①	36.86 $\pm$ 2.59
实验 3 组	3	0.67 $\pm$ 0.05 ^①	0.59 $\pm$ 0.04 ^①	56 $\pm$ 6 ^①	48.26 $\pm$ 4.91 ^①	24.36 $\pm$ 1.69 ^①	41.20 $\pm$ 3.24 ^①	23.21 $\pm$ 2.04 ^①	35.59 $\pm$ 2.63
F 值		75.46	133.91	32.15	25.20	77.08	36.96	50.09	0.39
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.764

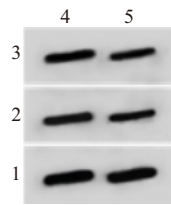
注:P21 为周期素依赖激酶抑制剂 p21,caspase-3 为胱天蛋白酶-3。

①与对照组比较, $P < 0.05$ 。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—胱天蛋白酶-3(caspase-3);3—周期素依赖激酶抑制剂 p21(P21);4—实验3组+pcDNA3.1;5—实验3组+pcDNA3.1-LINC01606。

图1 过表达 LINC01606 能逆转艾叶乙酸乙酯提取物对细胞 P21、caspase-3 蛋白表达的影响



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—胱天蛋白酶-3(caspase-3);3—周期素依赖激酶抑制剂 p21(P21);4—实验3组+anti-miR-NC;5—实验3组+anti-miR-26b。

图2 抑制 miR-26b 能逆转艾叶乙酸乙酯提取物对细胞 P21、caspase-3 蛋白表达的影响

2.5 LINC01606 靶向调控 miR-26b TargetScan 预测发现 miR-26b 序列中含有与 LINC01606 互补的位点,见图3。双荧光素酶报告实验表明,与 miR-NC 组相比,miR-26b 组的 WT-LINC01606 报告载体的荧光素酶活性(0.92 ± 0.05 比 0.29 ± 0.03)显著降低($t=18.71, P<0.001$), MUT-LINC01606 报告载体的荧光素酶活性(0.95 ± 0.06 比 0.94 ± 0.06)差异无统计学意义($t=0.20, P=0.848$),说明两者存在靶向结合关系。qRT-PCR 结果发现, pcDNA3.1 组、pcDNA3.1-LINC01606 组、si-NC 组、si-LINC01606 组 miR-26b 表

达水平分别为 0.99 ± 0.06 、 0.35 ± 0.04 、 0.98 ± 0.06 、 1.49 ± 0.09 ,四组整体比较差异有统计学意义($F=154.81, P<0.001$);过表达 LINC01606 可下调 miR-26b 的含量($P<0.05$),抑制 LINC01606 可上调 miR-26b 的含量($P<0.05$)。说明 LINC01606 靶向调控 miR-26b。

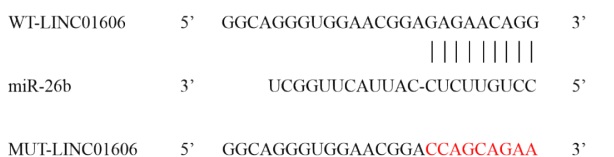


图3 TargetScan 预测发现 LINC01606 靶向 miR-26b

3 讨论

越来越多的研究表明,中医药联合化疗和放疗等方式可有效改善肿瘤病人预后^[9]。艾叶是菊科蒿属植物艾的干燥叶子,在我国各地生长广泛,具有祛寒止痛、温经止血的作用,它的提取物包括挥发油类、黄酮类、三萜类、桉叶烷类等,具有抗氧化、抗菌抗病毒、抗肿瘤、肝胆保护和提高免疫力等功能^[10]。蕲艾鞣酸可抑制肝癌细胞 HepG2 细胞增殖并促进细胞凋亡^[11]。艾叶乙酸乙酯提取物对乙型肝炎病毒 HBV 有限制的抑制作用^[8]。本研究提取艾叶乙酸乙酯提取物并处理结直肠癌细胞,发现 12.5 mg/L、25 mg/L、50 mg/L 艾叶乙酸乙酯提取物可抑制结直肠癌细胞 SW1116 的克隆形成数,降低细胞存活率,提高细胞凋亡率和细胞中 P21、caspase-3 蛋白含量,抑制细胞增殖并促进细胞凋亡,50 mg/L 的艾叶乙酸乙酯提取物对 SW1116 细胞的抑制率约为 50%,验证了艾叶乙酸乙酯提取物的抗肿瘤作用,但

表3 过表达 LINC01606 能逆转艾叶乙酸乙酯提取物对细胞 SW1116 增殖、凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	LINC01606	P21	caspase-3	克隆形成数	存活率/%	凋亡率/%	G1/%	S/%	M/%
实验3组+pcDNA3.1	3	1.00 ± 0.09	0.66 ± 0.05	0.57 ± 0.04	57 ± 6	48.53 ± 4.96	24.27 ± 1.64	41.21 ± 3.22	23.23 ± 2.05	35.56 ± 2.67
实验3组+pcDNA3.1-LINC01606	3	1.92 ± 0.12	0.29 ± 0.03	0.25 ± 0.03	112 ± 8	89.34 ± 7.21	10.09 ± 1.27	31.65 ± 2.36	32.11 ± 2.51	36.24 ± 2.71
t 值		10.62	10.99	11.08	9.49	8.08	11.84	7.18	8.22	0.54
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.599

注:P21 为周期素依赖激酶抑制剂 p21, caspase-3 为胱天蛋白酶-3。

表4 抑制 miR-26b 能逆转艾叶乙酸乙酯提取物对细胞 SW1116 增殖、凋亡的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-26b	P21	caspase-3	克隆形成数	存活率/%	凋亡率/%	G1/%	S/%	M/%
实验3组+anti-miR-NC	3	1.01 ± 0.07	0.68 ± 0.05	0.58 ± 0.05	55 ± 6	48.19 ± 4.88	24.31 ± 1.65	41.20 ± 3.25	23.25 ± 2.02	35.55 ± 2.63
实验3组+anti-miR-26b	3	0.35 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.34 ± 0.03	103 ± 8	82.15 ± 7.03	13.16 ± 1.31	35.31 ± 2.73	29.17 ± 2.21	35.52 ± 2.66
t 值		14.18	9.50	7.13	8.47	6.87	9.17	4.16	5.93	0.02
P 值		<0.001	<0.001	0.002	0.001	0.002	<0.001	0.001	<0.001	0.981

注:P21 为周期素依赖激酶抑制剂 p21, caspase-3 为胱天蛋白酶-3。

其具体机制尚不清楚。

有研究表明,miR-26b在结直肠癌组织中的表达显著低于癌旁组织,miR-26b的过表达可靶向抑制 Zeste 基因增强子人类同源物 2(EZH2)表达,抑制癌细胞增殖、侵袭及迁移^[12]。研究也发现,miR-26b在结直肠癌三个细胞系中表达显著降低,可通调控核因子 E2 相关因子 3(NFE2L3)促进结直肠癌恶性进展^[13],且 miR-26b在体内可增强 5-FU 对肿瘤生长的抑制作用^[6]。miR-26b在卵巢癌、乳腺癌、肺癌等中低表达,miR-26b发挥肿瘤抑制因子的作用,其过表达可抑制肿瘤细胞增殖,并可抑制胃癌的紫杉醇的化疗耐药性^[14-18]。本研究通过 TargetScan 预测发现,miR-26b可能是 LINC01606的靶点。LINC01606在胃癌中表达水平升高,并通过 Wnt/ β -连环蛋白信号通路调控癌细胞的转移和侵袭^[19]。基于以上结果,本研究假设艾叶乙酸乙酯提取物可能通过调控 LINC01606/miR-26b 途径抑制结直肠癌细胞的增殖,并促进细胞凋亡。本研究经检测发现,艾叶乙酸乙酯提取物可提高 SW1116 细胞中 miR-26b 的水平并降低 LINC01606 的水平,呈显著剂量依赖性。本研究结果表明,过表达 LINC01606 和抑制 miR-26b 均可逆转艾叶乙酸乙酯提取物对 SW1116 细胞增殖和凋亡的影响;而双荧光素酶报告系统结果表明,LINC01606 靶向负调控 miR-26b。

综上所述,50 mg/L 的艾叶乙酸乙酯提取物对结直肠癌 SW1116 细胞的抑制率约为 50%,艾叶乙酸乙酯提取物可能通过调控 LINC01606/miR-26b 抑制 SW1116 细胞增殖,促进细胞凋亡。艾叶乙酸乙酯提取物对结直肠癌具有潜在的抑制作用。本研究只进行了一种结直肠癌细胞的体外实验,下一步将进行动物模型体内实验,进一步为艾叶乙酸乙酯提取物对结直肠癌的抑制作用提供数据支撑。

参考文献

- [1] 张晶焱,张玉,王晓露. 归芍六君汤加减联合含雷替曲塞方案化疗治疗晚期结直肠癌 31 例[J]. 浙江中医杂志, 2018, 53(6):446-447.
- [2] 黄丽霞,胡松,冯凌雁,等. 鸦胆子油联合卡培他滨通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路诱导人结直肠癌细胞周期阻滞和增殖抑制[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(3):115-121.
- [3] 郑婷婷,田瑞昌,刘国辉,等. 艾叶及其燃烧产物有效成分的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1):241-244.
- [4] 戴小军. 艾叶提取物体外抗肿瘤作用的实验研究及机理探讨[D]. 扬州:扬州大学, 2006.
- [5] 刘延庆,戴小军,高鹏,等. 艾叶提取物抗肿瘤活性的体外实验研究[J]. 中药材, 2006, 29(11):1213-1215.
- [6] WANG B, LU FY, SHI RH, et al. MiR-26b regulates 5-FU-resistance in human colorectal cancer via down-regulation of Pgp[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(12):2518-2527.
- [7] 黄青梅,罗雅军,谭榜宪,等. 胃癌组织长链非编码 RNA LINC01606 表达及其临床意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(23):1627-1631, 1637.
- [8] 王可,闫文明. 艾叶提取物对 HepG2.2.15 细胞凋亡和乙型肝炎病毒复制的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(15):1992-1995.
- [9] 李晶,王胜奇,王能,等. 中医药在肿瘤免疫治疗中的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(8):86-91.
- [10] 兰晓燕,张元,朱龙波,等. 艾叶化学成分、药理作用及质量研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(17):4017-4030.
- [11] 张蒙,于丹,崔磊,等. 艾叶挥发油化学成分研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(4):777-781, 771.
- [12] XU M, CHEN XX, LIN K, et al. lncRNA SNHG6 regulates EZH2 expression by sponging miR-26a/b and miR-214 in colorectal cancer[J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1):3.
- [13] 黄波,李慧雯,常诚. miR-26b-5p 通过靶向 NFE2L3 调控结直肠癌细胞生长、迁移和侵袭[J]. 实用医学杂志, 2022, 38(2):160-167.
- [14] 徐双,李荣,冯君阳. miR-26b、miR-1182 在卵巢癌组织中的表达及其临床意义[J]. 实验与检验医学, 2021, 39(5):1110-1113.
- [15] MA SQ, WEI H, WANG CY, et al. MiR-26b-5p inhibits cell proliferation and EMT by targeting MYCBP in triple-negative breast cancer [J/OL]. Cell Mol Biol Lett, 2021, 26: 00288-3. DOI: 10.1186/s11658-021-00288-3.
- [16] ZHAO BC, ZHANG J, CHEN XX, et al. Mir-26b inhibits growth and resistance to paclitaxel chemotherapy by silencing the CDC6 gene in gastric cancer[J]. Arch Med Sci, 2019, 15(2):498-503.
- [17] ZHANG R, NIU Z, PEI H, et al. Long noncoding RNA LINC00657 induced by SP1 contributes to the non-small cell lung cancer progression through targeting miR-26b-5p/COMMD8 axis [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(4):3340-3349.
- [18] LI H, SUN Q, HAN B, et al. MiR-26b inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation, migration, and invasion by targeting EphA2[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5):4782-4790.
- [19] LUO YJ, TAN W, JIA WK, et al. The long non-coding RNA LINC01606 contributes to the metastasis and invasion of human gastric cancer and is associated with Wnt/ β -catenin signaling[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2018, 103:125-134.

(收稿日期:2020-01-16,修回日期:2022-07-15)