

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.04.0380

· 论 著 ·

知母皂苷 B-II 抑制人胃癌细胞增殖和迁移的作用机制

庞涛[△], 陆文铨[△], 陈小玲, 陈万生*

海军军医大学(第二军医大学)长征医院药学部, 上海 200003

[摘要] **目的** 研究知母皂苷 B-II 抑制人胃癌细胞株 BGC-823 和 MGC-803 增殖及迁移的作用机制。**方法** 使用终浓度为 50 ng/mL 的知母皂苷 B-II 处理 BGC-823 和 MGC-803 细胞 48 h, 用 qPCR 和蛋白质印迹实验分别检测细胞内清道夫受体 A5 (SCARA5) 的 mRNA 含量及蛋白表达; 采用生物信息学方法预测 hsa-miRNA-766-3p 与 SCARA5 3' UTR 区的结合位点, 并通过荧光素酶报告基因实验进行验证; 转染 hsa-miRNA-766-3p mimic 或 siRNA-SCARA5 至 BGC-823、MGC-803 细胞, 24 h 后使用 50 ng/mL 知母皂苷 B-II 处理细胞 48 h, 用 qPCR 和蛋白质印迹实验检测细胞内 hsa-miRNA-766-3p 相对含量和 SCARA5 蛋白表达, MTT 法检测细胞的增殖活性及迁移能力。**结果** 50 ng/mL 知母皂苷 B-II 处理 BGC-823、MGC-803 细胞 48 h 能增强肿瘤细胞中 SCARA5 蛋白表达 ($P < 0.01$), 而 SCARA5 mRNA 相对含量变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与报告基因表达载体单独转染比较, hsa-miRNA-766-3p mimic 和 hsa-miRNA-766-3p inhibitor 与野生型荧光素酶报告基因共转染可分别抑制和增强细胞内荧光素酶活性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); hsa-miRNA-766-3p mimic 和 hsa-miRNA-766-3p inhibitor 转染对突变型荧光素酶报告基因载体荧光素酶活性无明显影响 ($P > 0.05$)。50 ng/mL 知母皂苷 B-II 处理 BGC-823、MGC-803 细胞 48 h, 细胞内 hsa-miRNA-766-3p 含量均降低, SCARA5 蛋白表达则升高 ($P < 0.01$); hsa-miRNA-766-3p mimic 转染+皂苷处理与单纯皂苷处理比较, 细胞内 hsa-miRNA-766-3p 含量上升 ($P < 0.01$)、SCARA5 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); siRNA-SCARA5 转染+皂苷处理与单纯皂苷处理比较, 细胞内 hsa-miRNA-766-3p 含量无明显变化 ($P > 0.05$), 但 SCARA5 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。细胞增殖及迁移实验检测结果表明, 与细胞对照或溶媒对照比较, 经知母皂苷 B-II 处理的胃癌细胞 BGC-823 和 MGC-803 增殖活性及迁移能力均降低 ($P < 0.01$), siRNA-SCARA5 转染+皂苷处理的细胞增殖活性和迁移能力与单纯皂苷处理的细胞相比增强 ($P < 0.01$)。**结论** 知母皂苷 B-II 能够抑制 hsa-miRNA-766-3p 的表达, 进而上调其靶基因 SCARA5 的表达, 最终抑制胃癌细胞 BGC-823 和 MGC-803 的增殖和迁移。

[关键词] 胃癌; 知母皂苷 B-II; 清道夫受体 A5; hsa-miRNA-766-3p; 增殖; 迁移**[中图分类号]** R 735.2; R 969**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2018)04-0380-08

Inhibitory mechanism of timosaponin B-II against proliferation and migration of human gastric cancer cells

PANG Tao[△], LU Wen-quan[△], CHEN Xiao-ling, CHEN Wan-sheng*

Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To explore the inhibitory mechanism of timosaponin B-II against the proliferation and migration of human gastric cancer cell lines BGC-823 and MGC-803. **Methods** BGC-823 and MGC-803 cells were treated with timosaponin B-II (50 ng/mL) for 48 h, and the mRNA and protein expressions of scavenger receptor A5 (SCARA5) were measured by qPCR and Western blotting, respectively. The binding site of hsa-miRNA-766-3p in SCARA5 gene 3' UTR was predicted by bioinformatics, and was validated by luciferase report assay. After transfecting with hsa-miRNA-766-3p mimic or siRNA-SCARA5 for 24 h, the BGC-823 and MGC-803 cells were treated with timosaponin B-II (50 ng/mL) for 48 h. The relative levels of hsa-miRNA-766-3p and SCARA5 protein expression were detected by qPCR and Western blotting, respectively. The proliferation and migration abilities of cells were determined by MTT. **Results** The expressions of SCARA5 protein in BGC-823 and MGC-803

[收稿日期] 2017-12-19 **[接受日期]** 2018-03-15**[基金项目]** 上海市科委科技支撑项目(15401972200), 上海市临床药学重点专科建设项目(2016-40044-002), 上海市卫生计生系统重要薄弱学科建设计划(2016ZB0303). Supported by Science and Technology Supporting Program of Shanghai Science and Technology Committee (15401972200), Key Special Project of Clinical Pharmacy of Shanghai (2016-40044-002), and Important Weak Subject Construction Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (2016ZB0303).**[作者简介]** 庞涛, 硕士生, 主管药师. E-mail: yckpangtao@smmu.edu.cn; 陆文铨, 博士, 副主任药师. E-mail: lwqp@smmu.edu.cn[△]共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-65307133, E-mail: chenwansheng@smmu.edu.cn

cells treated with timosaponin B-II (50 ng/mL) for 48 h were significantly increased versus the control group ($P<0.01$), while no significant difference was found in relative mRNA level of SCARA5 between the timosaponin B-II treated cell group and the control group ($P>0.05$). Compared with transfection of reporter gene expression vector alone group, the luciferase activity was significantly inhibited or enhanced in the cells co-transfected with hsa-miRNA-766-3p mimic or hsa-miRNA-766-3p inhibitor and wild-type luciferase reporter gene ($P<0.05$, $P<0.01$). No change was observed between the cells co-transfected with hsa-miRNA-766-3p mimic or hsa-miRNA-766-3p inhibitor and mutant-type luciferase reporter gene expression vector and the cells transfected with reporter gene expression vector alone ($P>0.05$). Hsa-miRNA-766-3p levels were significantly decreased and SCARA5 protein expressions were significantly increased in BGC-823 and MGC-803 cells treated with 50 ng/mL timosaponin B-II ($P<0.01$). Compared with the timosaponin B-II treatment group, hsa-miRNA-766-3p levels were significantly increased and SCARA5 protein expressions were significantly decreased in the BGC-823 and MGC-803 cells of the hsa-miRNA-766-3p mimic transfection+timosaponin B-II treatment group ($P<0.01$). There were no differences in the hsa-miRNA-766-3p levels between the hsa-miRNA-766-3p mimic transfection+timosaponin B-II treatment group and the timosaponin B-II treatment group ($P>0.05$), but SCARA5 protein expressions were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with cell control group and vehicle control group, the proliferation and migration abilities of BGC-823 and MGC-803 cells were significantly inhibited by timosaponin B-II ($P<0.01$). Compared with the timosaponin B-II treatment group, the proliferation and migration abilities of BGC-823 and MGC-803 cells were significantly increased in the siRNA-SCARA5 transfection+timosaponin B-II treatment group ($P<0.01$).

Conclusion Timosaponin B-II can inhibit the proliferation and migration of BGC-823 and MGC-803 cells via suppressing hsa-miRNA-766-3p and upregulating the target gene SCARA5.

[Key words] gastric carcinoma; timosaponin B-II; scavenger receptor A5; hsa-miRNA-766-3p; proliferation; migration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(4): 380-387]

在全球范围内,胃癌致死率位居所有恶性肿瘤第2位^[1];在我国,胃癌发病率位居恶性肿瘤首位,且首次检出即发生淋巴结转移的比例高达50%~75%,而胃癌转移是导致胃癌患者预后不良或死亡的主要原因^[2]。近年来,各种新的疗法被用于临床治疗胃癌,但是由于胃癌患者绝对数量的增加,胃癌导致的病死率依然没有得到明显控制。胃癌临床治疗以手术切除为主,术前、术后化疗为辅,但术后仍然具有较高的复发率和转移率,晚期胃癌患者5年生存率小于30%^[3]。因此,研究配合手术使用的新高效化疗药物是降低胃癌术后复发的有效手段。

知母皂苷 B-II (timosaponin B-II) 为知母总皂苷的主要化学成分和活性物质,研究表明其具有抗炎^[4-6]、抗抑郁^[7]等作用,对于其抗肿瘤活性研究较少。我们发现知母皂苷 B-II 对于胃癌细胞的增殖和迁移具有良好的抑制效果,本研究通过利用知母皂苷 B-II 干预人胃癌细胞,以期初步阐明知母皂苷 B-II 抑制胃癌细胞增殖和迁移的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料 人胃癌细胞 BGC-823、MGC-803 和 293 工具细胞株均购于中国科学院典型培养物保

藏委员会细胞库; DMEM 高糖培养液、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、转染试剂 Lipofectamine 3000、TRIzol 试剂、反转录试剂盒 (M-MLV) 和 qPCR 检测试剂盒均购于美国 Invitrogen 公司; 荧光素酶报告基因表达载体和荧光素酶检测试剂盒均购于美国 Promega 公司; 清道夫受体 A5 (scavenger receptor A5, SCARA5) 蛋白一抗及二抗均购于英国 Abcam 公司; 细胞总蛋白提取定量试剂盒、化学发光试剂盒均为美国 Thermo 公司产品; RNA 和 DNA 合成由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成; 四甲基偶氮唑盐 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT] 和二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 均购于美国 Sigma 公司。AB0311 型细胞培养箱、Multiskan MK3 型酶标仪和 NanoDrop 2000 型紫外分光光度检测仪均为美国 Thermo 公司产品; 电泳仪、垂直电泳槽及转膜仪购于北京六一生物科技有限公司; 7500 型 PCR 仪为美国 ABI 公司产品。

1.2 细胞培养 BGC-823 和 MGC-803 细胞均为贴壁生长,在含 10% FBS 的 DMEM 培养液中,37℃、5% CO₂ 条件下培养至细胞贴壁密度达 70%,用 0.25% 胰蛋白酶消化,传代培养。以 DMSO 为溶

媒,将知母皂苷 B-II 配制成 50 $\mu\text{g/mL}$ 的母液,使用时培养液中的终浓度为 50 ng/mL 。

1.3 知母皂苷 B-II 对 BGC-823 和 MGC-803 细胞内 SCARA5 基因转录及蛋白表达的影响 接种对数生长期的 BGC-823 和 MGC-803 细胞至 6 孔培养板,每孔接种 2×10^5 个细胞,正常条件下过夜培养。使用 2 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养液对细胞全量换液,将细胞分为 3 组:细胞对照组、溶媒对照组和皂苷处理组。其中,皂苷处理组加入终浓度为 50 ng/mL 的知母皂苷 B-II [半数抑制浓度 (IC_{50}) = 50 ng/mL],溶媒对照组加入 1 μL 的 DMSO,细胞对照组不做任何处理。加药后细胞在正常条件下继续培养 48 h,收集细胞,分别提取细胞总 RNA 和细胞总蛋白,qPCR 和蛋白质印迹法分别检测各组细胞内 SCARA5 的 mRNA 和蛋白表达。

1.4 荧光素酶报告基因表达载体构建 根据 hsa-miRNA-766-3p 与 SCARA5 基因 3' UTR 区的结合位点预测结果,设计包含结合位点且与 SCARA5 3' UTR 区完全同源的长链 DNA,上游序列 5'-CTA GAG GTT CAG AGG CTG GAG CGG TTC AGA GGC TGG AGC GGT TCA GAG GCT GGA GC-3',下游序列 5'-AGA TCG CTC CAG CCT CTG AAC CGC TCC AGC CTC TGA ACC GCT CCA GCC TCT GAA CC-3'。长链 DNA 经退火形成双链后克隆至荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-promoter,构建荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-WT-SCARA5 (含有野生型 hsa-miRNA-766-3p 结合位点)。同时,将预测结合位点进行错义突变,即由 5'-GCU GGA G-3' 突变为 5'-AGG CUG G-3',用相同方法构建突变型荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-MT-SCARA5 (hsa-miRNA-766-3p 结合位点突变型)。重组载体经序列分析无误后,扩增转化菌株,进行无内毒素质粒 DNA 提取,提取过程严格按照试剂盒说明书进行。提取完成后用紫外分光光度法测定质粒 DNA 浓度,并使用无菌水将质粒 DNA 终浓度调整至 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$,于 -20°C 保存。

1.5 RNA 合成 从 NCBI 数据库中查找 SCARA5 (NM_173833.5) 基因信息,根据 SCARA5 基因编码区信息,使用在线设计软件设计针对其编码区的 siRNA 序列 5'-GGU GCA GGA CGC GCU GCA Gtt-3' 及错义 (NC) 序列 5'-CUC GAG GCG UGC

AAG CGG Gtt-3',然后合成互补的 siRNA 序列。同时化学合成 hsa-miRNA-766-3p mimic (5'-CGA CUC CGA CAC CCC GAC CUC Att-3')、hsa-miRNA-766-3p inhibitor (5'-TGA GGU CGG GGU GUC GGA GUC Gtt-3'),转染实验前均先退火形成双链。

1.6 Hsa-miRNA-766-3p 与 SCARA5 靶位关系验证 选取对数生长期的 BGC-823 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,制备细胞悬液,锥虫蓝染色并进行活细胞计数,使用 DMEM+10% FBS 完全培养液重悬细胞并调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,接种细胞至 24 孔板,每孔加 0.5 mL 细胞悬液,正常条件下培养 24 h,进行质粒 DNA 与 RNA 共转染实验。转染分为 9 组:293 细胞对照组、pGL3-WT-SCARA5 转染组、pGL3-MT-SCARA5 转染组、hsa-miRNA-766-3p mimic+pGL3-WT-SCARA5 转染组、hsa-miRNA-766-3p mimic+pGL3-MT-SCARA5 转染组、hsa-miRNA-766-3p NC+pGL3-WT-SCARA5 转染组、hsa-miRNA-766-3p NC+pGL3-MT-SCARA5 转染组、hsa-miRNA-766-3p inhibitor+pGL3-WT-SCARA5 转染组、hsa-miRNA-766-3p inhibitor+pGL3-MT-SCARA5 转染组。转染试剂及 DNA、RNA 用量严格参照 Lipofectamine 3000 转染试剂说明书的要求,同时,每组细胞转染 40 ng 海肾荧光素酶表达质粒 (pGL3-TK) 作为荧光素酶活性的参照。细胞转染 24 h 后,使用完全培养液全量换液后在正常条件下继续培养 48 h,使用双荧光素酶检测系统检测各组细胞荧光素酶活性。

1.7 BGC-823 和 MGC-803 细胞共转染实验 实验分为 5 组:细胞对照组 (不做处理)、溶媒对照组 (DMSO)、皂苷处理组 (50 ng/mL 知母皂苷 B-II)、hsa-miRNA-766-3p mimic 转染+皂苷处理组 (hsa-miRNA-766-3p mimic 转染后 24 h 以 50 ng/mL 知母皂苷 B-II 处理) 和 siRNA-SCARA5 转染+皂苷处理组 (siRNA-SCARA5 转染 24 h 后以 50 ng/mL 知母皂苷 B-II 处理)。取对数生长期的 BGC-823 和 MGC-803 细胞,用 0.25% 胰酶消化后收集细胞,1 000 $\times g$ 离心 2 min,收集细胞,使用含 10% FBS 的 DMEM 培养液重悬细胞,并调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$,接种细胞至 6 孔培养板,每孔添加 2 mL 细胞悬液,37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h,然后进行转染实验,转染过程及 RNA 用量完全参照 Lipofectamine 3000 转染试剂说明书

的要求。转染 24 h 后,使用含 10% FBS 的 DMEM 培养液对细胞进行全量换液,正常条件下继续培养 48 h。收集细胞,提取细胞总 RNA,用 qPCR 法检测 hsa-miRNA-766-3p 含量;提取细胞总蛋白,用蛋白质印迹法检测细胞内 SCARA5 蛋白表达量。

1.8 细胞增殖活性检测 实验分为 4 组:细胞对照组、溶媒对照组、皂苷处理组、siRNA-SCARA5 转染+皂苷处理组,处理方式与 1.7 项相同。细胞接种于 96 孔培养板,每孔 1×10^5 个细胞。活性检测前每孔加入 10 μ L 质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,轻晃使其分布均匀,正常条件下继续培养 4 h,去上清,每孔加入 100 μ L DMSO 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,酶标仪检测读取各孔在 490 nm 波长处的光密度 (D) 值,然后根据 D 值绘制细胞增殖生长曲线。

1.9 细胞迁移能力检测 实验分组和处理方式与 1.8 项相同,细胞接种于 6 孔培养板,每孔 2×10^5 个细胞,细胞转染且经皂苷处理 48 h 后,用胰酶消化细胞,重新接种至 6 孔培养板,过夜培养后全量换液,使用无菌 200 μ L 枪头划痕,显微镜记录划痕,再使用无血清培养液冲洗 2 次,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液 2 mL,正常条件下培养 48 h 后用显微镜拍同一划痕位置。

1.10 qPCR 检测 细胞经离心收集后,加入 1 mL 经 4 $^{\circ}$ C 预冷的 TRIzol 试剂,使用 1 mL 移液器反复吹打至细胞充分裂解,裂解液于 4 $^{\circ}$ C 下 $12\,000 \times g$ 离心 2 min,收集上清,酚氯仿法提取细胞总 RNA。提取完成后行琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 条带完整性,紫外分光光度法测定 RNA 浓度。每组样本取 2 μ g 总 RNA,反转录制备 cDNA,反转录过程使用特异反转录引物 hsa-snRNA U6 (5'-TAC CTT GCG AAG TGC TTA AAC-3') 和 hsa-miRNA-766-3p (5'-GTC GTA TCC AGT GCG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TGC ACT GGA TAC GAT GAG G-3'), SCARA5 反转录使用 Oligo dT18 引物,反转录体系及实验条件严格按照 M-MLV 试剂盒说明书进行。取 2 μ L 反转录产物作为 PCR 反应模板,qPCR 检测 hsa-miRNA-766-3p 和 SCARA5 mRNA 相对含量。PCR 特异引物序列:U6 上游引物 5'-GTG CTC GCT TCG GCA GCA CAT-3',下游引物 5'-TAC CTT GCG AAG TGC TTA AAC-3'; hsa-miRNA-766-3p 上游引物 5'-GCC GGC GCC CGA GCT CTG GCT

C-3',下游引物 5'-CGA CTC CGA CAC CCC GAC CTC A-3'; SCARA5 上游引物 5'-GGC CCT GAC TCG CAA TGT G-3',下游引物 5'-AAC GAG TCT GAC TGG TTC TGC-3'; β -actin (NM_001101.3) 上游引物 5'-CCC AAG GCC AAC CGC GAG AAG ATG-3',下游引物 5'-GTC CCG GCC AGC CAG GTC CAG A-3'。PCR 反应体系:SYBR Premix Ex Taq 10 μ L,上、下游引物 (20 μ mol/L) 各取 0.2 μ L,模板使用量为 2 μ L,反应体系用 dH₂O 补足至 20 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 变性 10 s;58 $^{\circ}$ C 退火 10 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,共 42 个循环。数据分析使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,目的基因相对于内参基因的表达量为 $2^{\Delta Ct} = 2^{Cm - Cn}$ (m 为目的基因; n 为内标基因)。

1.11 蛋白质印迹检测 细胞经离心收集后,每样本加入 1 mL 细胞裂解液 M-PER,充分裂解后用 BCA 法进行蛋白定量。蛋白提取及定量过程严格按照试剂盒说明书进行。每样本取 10 μ g 总蛋白进行十二烷基硫酸钠 (SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳,对凝胶进行丽春红染色观察蛋白条带是否完整,转膜;5% 脱脂牛奶封闭 2 h,TBST 洗膜 3 遍,4 $^{\circ}$ C 一抗过夜孵育;SCARA5 和 β -actin 一抗稀释 (TBST 稀释) 比分别为 1:300 和 1:1 000,TBST 洗膜 3 次,二抗孵育 2 h,兔抗鼠二抗稀释比为 1:3 500;TBST 洗膜 3 次,添加化学发光液反应底物,暗室曝光,扫描曝光底片,目的蛋白与内参蛋白条带 D 值的比值即为 SCARA5 蛋白的相对表达量。

1.12 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,实验所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,其中多组资料两两比较采用 LSD 多重检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 知母皂苷 B-II 对 BGC-823 和 MGC-803 细胞内 SCARA5 基因转录及蛋白表达的影响 qPCR 检测结果 (图 1A、1C) 显示,与细胞对照组或溶媒对照组比较,50 ng/mL 知母皂苷 B-II 处理细胞 48 h,BGC-823 和 MGC-803 细胞内 SCARA5 mRNA 含量无明显变化 ($P > 0.05$),而细胞内 SCARA5 蛋白表达增强,皂苷处理组的 SCARA5 蛋白表达与细胞对照组或溶媒对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$,图 1B、1D)。

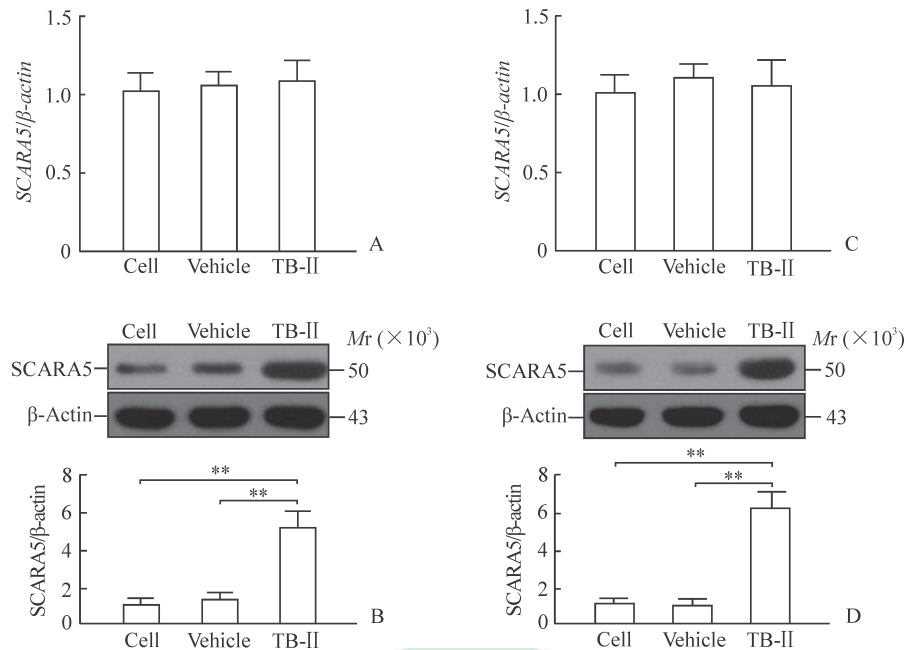


图1 知母皂苷B-II处理后BGC-823(A,B)和MGC-803细胞(C,D)内SCARA5的mRNA(A,C)和蛋白(B,D)表达结果
Fig 1 Expressions of SCARA5 mRNA (A, C) and protein (B, D) in BGC-823 (A, B) and MGC-803 cells (C, D) treated with TB-II
SCARA5: Scavenger receptor A5; TB-II: Timosaponin B-II. ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 知母皂苷B-II处理及SCARA5沉默对细胞增殖和迁移的影响 细胞增殖活性检测结果(图2A、2C)显示,50 ng/mL知母皂苷B-II处理BGC-823和MGC-803细胞48 h后,细胞增殖活性低于细胞对照组或溶媒对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$); siRNA-SCARA5转染+皂苷处理组与皂苷处理组比较细胞增殖活性增强,差异有统计学意义($P < 0.01$);溶媒对照组与细胞对照组比较,细胞增殖活性差异无统计学意义($P > 0.05$)。

细胞迁移能力检测结果(图2B、2D)显示,50 ng/mL知母皂苷B-II处理BGC-823和MGC-803细胞48 h时,两组细胞划痕宽度均大于细胞对照组和溶媒对照组,提示知母皂苷B-II可有效抑制细胞迁移;48 h时 siRNA-SCARA5转染+皂苷处理组与皂苷处理组比较,细胞划痕宽度明显变窄,表明经 siRNA-SCARA5转染后,细胞迁移能力增强;溶媒对照组与细胞对照组比较,细胞迁移能力无差异。

2.3 荧光素酶验证 hsa-miRNA-766-3p 与 SCARA5 基因结合位点 生物信息学预测结果显示, hsa-miRNA-766-3p 在 SCARA5 基因 3' UTR 区有 7 个碱基的结合位点,即种子区(图3A)。分别将 hsa-miRNA-766-3p mimic、hsa-miRNA-766-3p

inhibitor、hsa-miRNA-766-3p NC 与两组荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-WT-SCARA5 和 pGL3-MT-SCARA5 进行共转染,转染 48 h 后收集细胞进行荧光素酶活性检测,检测结果(图3B)显示, hsa-miRNA-766-3p mimic 能抑制野生型荧光素酶报告基因表达载体的荧光素酶活性,从 8.12 ± 1.12 降至 2.28 ± 0.32 ,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 hsa-miRNA-766-3p inhibitor 能增强野生型荧光素酶报告基因表达载体的荧光素酶活性,从 8.12 ± 1.12 上升至 11.56 ± 0.89 ,差异有统计学意义($P < 0.05$);对于突变型荧光素酶报告基因表达载体, hsa-miRNA-766-3p mimic 和 hsa-miRNA-766-3p inhibitor 对其均无明显影响。

2.4 Hsa-miRNA-766-3p 过表达及 SCARA5 沉默对知母皂苷B-II处理后两组胃癌细胞中 hsa-miRNA-766-3p 含量和 SCARA5 蛋白表达的影响 50 ng/mL 知母皂苷B-II处理BGC-823和MGC-803细胞48 h后,与细胞对照组和溶媒对照组比较,细胞内 hsa-miRNA-766-3p 含量均降低($P < 0.01$)、SCARA5 蛋白表达升高($P < 0.01$); hsa-miRNA-766-3p mimic 转染+皂苷处理组与皂苷处理组比较,细胞内 hsa-miRNA-766-3p 含量上升($P < 0.01$)、SCARA5 蛋白表达降低($P < 0.01$); siRNA-

SCARA5 转染 + 皂苷处理组与皂苷处理组比较, 细胞内 hsa-miRNA-766-3p 含量无明显

变化 ($P>0.05$), 但 SCARA5 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。见图 4。

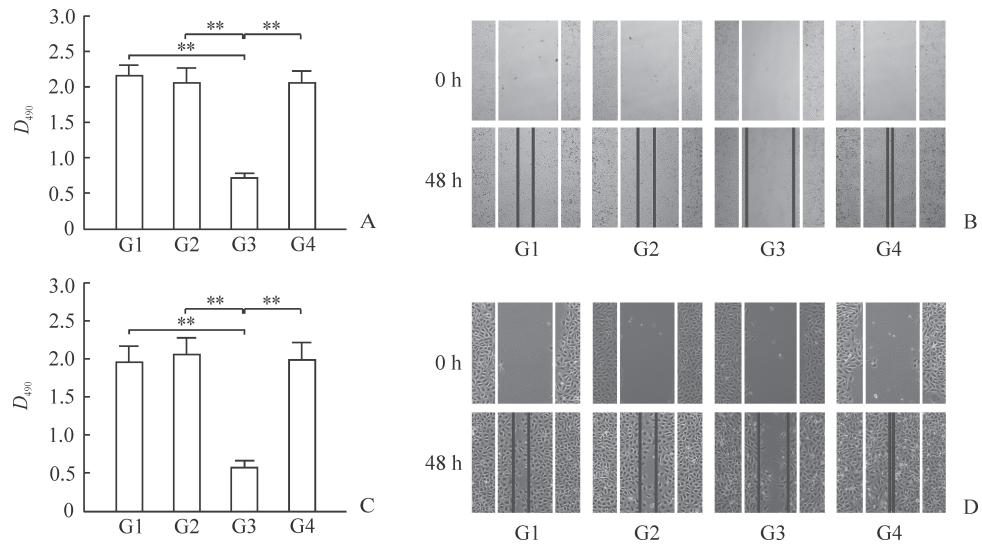


图 2 BGC-823 (A, B)、MGC-803 细胞 (C, D) 增殖活性 (A, C) 和迁移能力 (B, D) 检测结果

Fig 2 Proliferation activity (A, C) and migration ability (B, D) of BGC-823 (A, B) and MGC-803 cells (C, D)

G1: Cell control group; G2: Vehicle control group; G3: 50 ng/mL Timosaponin B- II treatment group; G4: 50 ng/mL Timosaponin B- II treatment plus siRNA-SCARA5 transfection group. SCARA5: Scavenger receptor A5. $**P<0.01$. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. Original magnification: $\times 160$ (B, D)

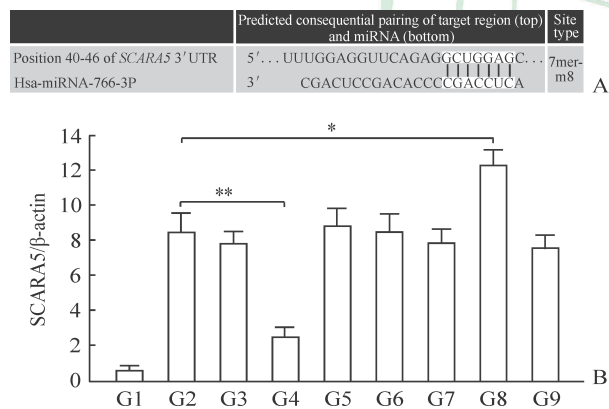


图 3 荧光素酶活性检测结果

Fig 3 Luciferase activity test results

A: Bioinformatics analysis of hsa-miRNA-766-3p and SCARA5 gene 3' UTR binding site; B: Luciferase activity test results of BGC-823 cells after 48 h of transfection. G1: BGC-823 control group; G2: pGL3-WT-SCARA5 transfection group; G3: pGL3-MT-SCARA5 transfection group; G4: Hsa-miRNA-766-3p mimic+pGL3-WT-SCARA5 transfection group; G5: Hsa-miRNA-766-3p mimic+pGL3-MT-SCARA5 transfection group; G6: NC+pGL3-WT-SCARA5 transfection group; G7: NC+pGL3-MT-SCARA5 transfection group; G8: Hsa-miRNA-766-3p inhibitor+pGL3-WT-SCARA5 transfection group; G9: Hsa-miRNA-766-3p inhibitor+pGL3-MT-SCARA5 transfection group. SCARA5: Scavenger receptor A5; UTR: Untranslated region. NC: Non-specific control; WT: Wild-type; MT: Mutant-type. $*P<0.05$, $**P<0.01$. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

SCARA5 基因位于人第 8 号染色体, 在原发性肝癌^[8-9]、骨肉瘤^[10]、乳腺癌^[11]和非小细胞肺癌^[12]的进展中具有重要作用, SCARA5 的缺失或者低表达会导致肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移能力的增强^[13]。目前, SCARA5 基因与胃癌关系的研究较少。

MiRNA 与肿瘤关系密切, 其通过调节肿瘤细胞的凋亡、周期、增殖和迁移对肿瘤进程产生多样化影响^[14-15]。MiRNA 与胃癌关系的研究较多, Zhang 等^[16]研究表明, 上调 miRNA-802 可以通过抑制癌基因 *RAB23* 的表达, 抑制胃癌细胞的肿瘤活性。转移是胃癌高病死率和低预后的主要原因, 有研究者指出, miRNA-143 和 miRNA-145 通过共同的目标基因 *MYO6* 调节胃癌的上皮间质转化和抑制转移^[17]。Eun 等^[18]发现, miRNA 与转录组调控网络间可以进行复杂的相互作用, 并且同时针对多个基因; miRNA-495-3p 作为一种有效的肿瘤抑制基因调控胃癌细胞的表现遗传修饰, 进而促进胃上皮细胞的增殖和恶性转化。上述研究表明, miRNAs 是多种肿瘤发病机制的内在原因, 其与胃癌的关系是复杂而全面的, 因而其也可以成为胃癌肿瘤基因治疗的切入点。

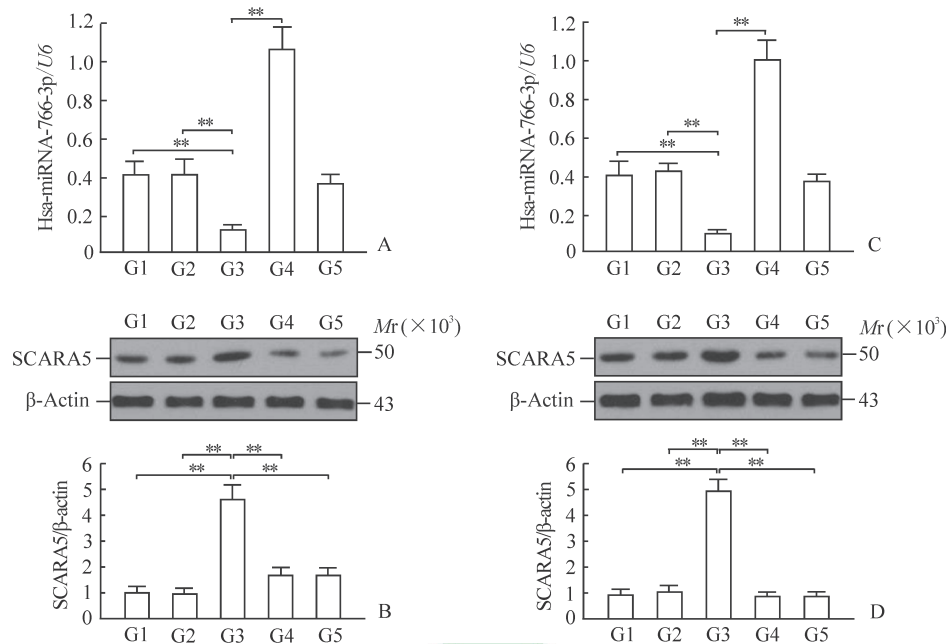


图4 Hsa-miRNA-766-3p 含量 (A, C) 和 SCARA5 蛋白 (B, D) 表达检测结果

Fig 4 Detection results of hsa-miRNA-766-3p content (A, C) and SCARA5 protein (B, D) expression

A, B: BGC-823 cell; C, D: MGC-803 cell. G1: Cell control group; G2: Vehicle control group; G3: 50 ng/mL Timosaponin B-II treatment group; G4: 50 ng/mL Timosaponin B-II treatment plus hsa-miRNA-766-3p mimic transfection group; G5: 50 ng/mL Timosaponin B-II treatment plus siRNA-SCARA5 transfection group. SCARA5: Scavenger receptor A5. ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

本研究首先使用知母皂苷 B-II 处理 2 种胃癌细胞株, 并对细胞内 SCARA5 的转录水平即蛋白表达进行了比对分析, 结果显示, 在 2 种胃癌细胞中 50 ng/mL 知母皂苷 B-II 均能上调 SCARA5 的表达, 而对 SCARA5 mRNA 含量无明显影响, 这表明知母皂苷 B-II 对 SCARA5 的表达促进属于转录后调控机制。作为经典的转录后调控途径之一, 我们首先想到在知母皂苷 B-II 和 SCARA5 蛋白调控之间是否存在一组关键的 miRNA。生物信息学预测 hsa-miRNA-766-3p 可能靶向调控 SCARA5, 我们通过荧光素酶报告基因实验证实了这个理论结合位点真实存在。为了证实知母皂苷 B-II 抑制胃癌细胞株增殖及迁移是通过 hsa-miRNA-766-3p 及其靶基因 SCARA5 实现的, 我们在给予 2 种胃癌细胞株知母皂苷 B-II 处理前先沉默 SCARA5 基因, 结果显示 SCARA5 基因沉默可以逆转知母皂苷 B-II 抑制 2 种胃癌细胞株增殖及迁移的作用和趋势, 由于 siRNA-SCARA5 转染导致的 SCARA5 基因沉默亦不受制于 hsa-miRNA-766-3p 含量降低的负向调控, 因此本研究结果揭示了 2 个重要的事实: (1) 知母皂苷 B-II 处理能够上调胃癌细胞内 SCARA5 蛋白表达, 这种调控作用可通过抑制

hsa-miRNA-766-3p 来完成; (2) 知母皂苷 B-II 抑制胃癌细胞的增殖和迁移, 主要是通过抑制肿瘤细胞内 hsa-miRNA-766-3p 含量来上调抑癌基因 SCARA5 表达完成。

本研究首次证实了知母皂苷 B-II 可以抑制人胃癌细胞株 BGC-823 和 MGC-803 的增殖与迁移能力, 首次解释了知母皂苷 B-II 抑制胃癌的作用途径为 hsa-miRNA-766-3p 表达抑制和其靶蛋白 SCARA5 的表达上调。知母皂苷 B-II 如何抑制肿瘤细胞内 hsa-miRNA-766-3p 表达将是未来研究工作的重点, 根据现有数据, 知母皂苷 B-II 很可能通过与某个可调控 hsa-miRNA-766-3p 转录的转录因子结合, 抑制转录因子活性。

[参考文献]

- [1] SMYTH E C, CUNNINGHAM D. Gastric cancer in 2012: defining treatment standards and novel insights into disease biology[J]. Nat Clin Oncol, 2013, 10: 73-74.
- [2] VILLANUEVA M T. Combination therapy: update on gastric cancer in East Asia[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8: 690.
- [3] LEUNG W K, WU M S, KAKUGAWA Y, KIM J J, YEOH K G, GOH K L, et al. Screening for gastric cancer

- in Asia: current evidence and practice[J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9: 279-287.
- [4] YUAN Y L, LIN B Q, ZHANG C F, CUI L L, RUAN S X, YANG Z L, et al. Timosaponin B- II ameliorates palmitate-induced insulin resistance and inflammation via IRS-1/PI3K/Akt and IKK/NF- κ B pathways[J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44: 755-769.
- [5] ZHANG T, WANG J, WANG S, MA C. Timosaponin B- II inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung toxicity via TLR/NF- κ B pathway[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2015, 25: 665-671.
- [6] LU W Q, QIU Y, LI T J, TAO X, SUN L N, CHEN W S. Timosaponin B- II inhibits proinflammatory cytokine induction by lipopolysaccharide in BV2 cells[J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32: 1301-1308.
- [7] ZHAO X, LIU C, QI Y, FANG L, LUO J, BI K, et al. Timosaponin B- II ameliorates scopolamine-induced cognition deficits by attenuating acetylcholinesterase activity and brain oxidative damage in mice[J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31: 1455-1461.
- [8] SUN G, ZHANG C, FENG M, LIU W, XIE H, QIN Q, et al. Methylation analysis of *p16*, *SLIT2*, *SCARA5*, and *Runx3* genes in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96: e8279. doi: 10.1097/MD.00000000000008279.
- [9] HUANG J, ZHENG D L, QIN F S, CHENG N, CHEN H, WAN B B, et al. Genetic and epigenetic silencing of *SCARA5* may contribute to human hepatocellular carcinoma by activating FAK signaling[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120: 223-241.
- [10] WEN X, WANG N, ZHANG F, DONG C. Overexpression of *SCARA5* inhibits tumor proliferation and invasion in osteosarcoma via suppression of the FAK signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13: 2885-2891.
- [11] YOU K, SU F, LIU L, LÜ X, ZHANG J, ZHANG Y, et al. *SCARA5* plays a critical role in the progression and metastasis of breast cancer by inactivating the ERK1/2, STAT3, and AKT signaling pathways[J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 435: 47-58.
- [12] LIU J, HU G, CHEN D, GONG A Y, SOORI G S, DOBLEMAN T J, et al. Suppression of *SCARA5* by Snail1 is essential for EMT-associated cell migration of A549 cells[J/OL]. *Oncogenesis*, 2013, 2: e73. doi: 10.1038/oncsis.2013.37.
- [13] 洪正东. Rock2 通过 β -catenin/TCF4 信号通路调控 *SCARA5* 表达影响肾癌细胞增殖的研究[D]. 南昌:南昌大学,2016.
- [14] MISHRA S, YADAV T, RANI V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 98: 12-23.
- [15] MOTTI M L, D'ANGELO S, MECCARIELLO R. MicroRNA, cancer and diet: facts and new exciting perspectives[J/OL]. *Curr Mol Pharmacol*, 2017 Oct 13. doi: 10.2174/1874467210666171013123733.
- [16] ZHANG X Y, MU J H, LIU L Y, ZHANG H Z. Upregulation of miR-802 suppresses gastric cancer oncogenicity via targeting *RAB23* expression[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21: 4071-4078.
- [17] LEI C, DU F, SUN L, LI T, LI T, MIN Y, et al. miR-143 and miR-145 inhibit gastric cancer cell migration and metastasis by suppressing MYO6[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8: e3101. doi: 10.1038/cddis.2017.493.
- [18] EUN J W, KIM H S, SHEN Q, YANG H D, KIM S Y, YOON J H, et al. MicroRNA-495-3p functions as a tumour suppressor by regulating multiple epigenetic modifiers in gastric carcinogenesis[J]. *J Pathol*, 2018, 244: 107-119.

[本文编辑] 尹 茶