



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.06.10

文章编号: 2095-1264(2022)06-0745-07

金粉蕨素通过 circ_0136666/miR-370 轴对肺癌 A549 细胞糖酵解、增殖、迁移和侵袭的影响

张洪岩¹, 朱宝杰¹, 范宜锋², 刘欢¹, 关嵩¹, 邹庆华^{2*}
(河北中石油中心医院¹放疗科, ²肿瘤科, 河北廊坊, 065000)

摘要: **目的** 探讨金粉蕨素(ONY)对肺癌 A549 细胞糖酵解、增殖、迁移和侵袭的影响及其作用机制。**方法** 体外培养 A549 细胞,用不同浓度(5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ONY 作用 24 h,转染 circ_0136666 的小干扰 RNA 至 A549 细胞,或将 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ONY 作用于转染 circ_0136666 过表达载体的 A549 细胞。酶联免疫吸附法检测细胞中的葡萄糖水平及细胞培养上清中的乳酸含量,CCK-8 检测细胞增殖,Transwell 检测细胞迁移和侵袭,Western blotting 检测 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达,RT-qPCR 检测 circ_0136666 和 miR-370 表达,双荧光素酶报告基因实验验证 A549 细胞中 circ_0136666 和 miR-370 的调控关系。**结果** 经 5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ONY 干预后,A549 细胞葡萄糖消耗量和乳酸产生量、细胞迁移数和侵袭数、Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平及 circ_0136666 表达水平明显降低($P<0.05$),而细胞增殖抑制率、miR-370 表达水平明显升高($P<0.05$),且具有剂量依赖性。circ_0136666 可靶向负调控 miR-370 的表达。沉默 circ_0136666 后,A549 细胞葡萄糖消耗量和乳酸产生量、细胞迁移和侵袭数、Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),而细胞增殖抑制率显著升高($P<0.05$)。过表达 circ_0136666 逆转了 ONY 对 A549 细胞糖酵解、增殖、迁移和侵袭的抑制作用。**结论** ONY 可抑制肺癌 A549 细胞的糖酵解、增殖、迁移和侵袭,其作用机制与调控 circ_0136666/miR-370 通路有关。

关键词: 金粉蕨素; 肺癌; circ_0136666; miR-370; 糖酵解; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

Effects of onychin on the glycolysis, proliferation, migration and invasion of lung cancer A549 cells via circ_0136666/miR-370 axis

ZHANG Hongyan¹, ZHU Baojie¹, FAN Yifeng², LIU Huan¹, GUAN Song¹, ZOU Qinghua^{2*}

(¹Radiotherapy Department, ²Oncology Department, Hebei PETRO China Central Hospital, Langfang, 065000, Hebei, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of onychin (ONY) on glycolysis, proliferation, migration and invasion of lung cancer A549 cells and its mechanism. **Methods** A549 cells were cultured *in vitro*. After treated with different concentrations of ONY (5, 10, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 24 h, A549 cells were transfected with circ_0136666 small interfering RNA. The A549 cells transfected with circ_0136666 over-expression vector were treated with 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ONY. The enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the glucose level in cells and the lactic acid content in the cell culture supernatant. CCK-8 was used to detect the cell proliferation, and Transwell was used to detect the cell migration and invasion. The protein expression levels of Ki-67, MMP-2 and MMP-9 were detected by Western blotting, and the expression levels of circ_0136666 and miR-370 were detected by RT-qPCR. The regulatory relationship between circ_0136666 and miR-370 in A549 cells was verified by the dual luciferase reporter gene assay. **Results** After A549 cells were interfered with 5, 10, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ONY, the glucose consumption and lactic acid production of the cells, were significantly reduced, as well as the number of migration and invasion cells, the protein expression levels of Ki-67, MMP-2 and MMP-9, and the expression

作者简介:张洪岩,男,主治医师,研究方向:肿瘤放射治疗。

*通信作者:邹庆华,女,主任医师,研究方向:肿瘤内科治疗。

level of circ_0136666 ($P<0.05$), while the cell inhibition rate and the expression level of miR-370 were significantly increased ($P<0.05$), and all were dose-dependent. The circ_0136666 negatively regulated the expression of miR-370. After silencing circ_0136666, the glucose consumption and lactic acid production of the cells, the number of migration and invasion cells, and the protein expression levels of Ki-67, MMP-2 and MMP-9 all were reduced ($P<0.05$), while the cell inhibition rate was increased ($P<0.05$). Overexpression of circ_0136666 partially restored the inhibitory effect of ONY on glycolysis, proliferation, migration and invasion of A549 cells. **Conclusion** ONY could inhibit the glycolysis, proliferation, migration and invasion of lung cancer cell A549, and its mechanism of action may be related to the regulation of circ_0136666/miR-370 pathway.

Keywords: Onychin; Lung cancer; circ_0136666; miR-370; Glycolysis; Proliferation; Migration; Invasion

前言

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率居我国恶性肿瘤之首^[1]。肺癌发病隐匿,易转移和复发。尽管手术联合放化疗及靶向治疗在肺癌的治疗中取得了较大成果,但晚期患者预后仍然较差,且现有的化疗药物均存在较强的副作用^[2]。因此,寻找治疗肺癌的高效、低毒药物是近年来的研究热点。金粉蕨素(onychin, ONY)是从蕨科金粉蕨属植物栗柄金粉蕨中提取得到的黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗氧化等功效。研究显示,ONY可通过线粒体凋亡途径降低宫颈癌细胞的增殖能力,并可诱导细胞凋亡^[3]。但ONY对肺癌细胞的作用机制目前未知。

环状RNA(circRNA)可与微小RNA(miRNA)靶向结合,对肿瘤的发生发展起重要作用^[4-5]。有报道称, circ_0136666在骨肉瘤组织中表达上调,可通过靶向 miR-593-3p/ZEB2轴抑制骨肉瘤细胞凋亡,促进其增殖、迁移和侵袭,发挥致癌作用,可作为骨肉瘤的治疗靶点^[6]。但目前, circ_0136666对肺癌细胞恶性生物学行为的影响还未知。Circular RNA Interactome生物在线软件(<https://circinteractome.nia.nih.gov/>)预测结果显示, circ_0136666可能与 miR-370存在相互作用,而 miR-370在肺癌组织中表达下调,上调其表达可抑制肺癌的发展进程^[7]。因此,本研究以肺癌A549细胞为研究对象,旨在探究ONY是否通过调控 circ_0136666/miR-370轴影响A549细胞的糖酵解、增殖、迁移和侵袭。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

肺癌A549细胞(中国科学院上海细胞库);金粉蕨素(上海源叶生物);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(浙江天杭生物), RPMI 1640培养基、Lipofectamine™ 2000试剂盒、CCK-8试剂盒(北京索莱宝

科技有限公司); si-circ_0136666si-NC、pcDNA-circ_0136666、pcDNA、mimcs、miR-NC、引物(上海生工生物工程有限公司);葡萄糖检测试剂盒和乳酸检测试剂盒(北京百奥莱博);兔抗人Ki-67、基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)、MMP-9和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体(北京中杉金桥);二喹啉甲酸(BCA)蛋白检测试剂盒和双荧光素酶活性检测试剂盒(上海碧云天);TRIzol试剂(美国Invitrogen公司);逆转录试剂盒、PCR试剂盒(大连宝生物)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染 复苏A549细胞,用含10% FBS的RPMI 1640培养基培养。将A549细胞接种于6孔板中,用脂质体法转染 si-NC、si-circ_0136666、pcDNA和 pcDNA-circ_0136666,再培养24 h,收集细胞用于后续实验。

1.2.2 细胞分组处理 将未转染的细胞分为对照组(Con组),低、中、高剂量ONY组(ONY-L、M、H组),其中Con组细胞常规培养,ONY-L组、ONY-M组和ONY-H组细胞分别用5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ONY培养^[8]。将转染 si-NC、si-circ_0136666的培养基记为 si-NC组、si-circ_0136666组。转染 pcDNA、pcDNA-circ_0136666的细胞用20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ONY培养,记为 ONY+pcDNA组、ONY+pcDNA-circ_0136666组。每组设3个复孔,实验重复3次。

1.2.3 试剂盒检测细胞中葡萄糖、乳酸含量 将细胞接种至24孔板,按照1.2.2分组处理,培养24 h后收集细胞。采用葡萄糖检测试剂盒检测细胞中的葡萄糖含量,乳酸检测试剂盒检测细胞中的乳酸含量。

1.2.4 CCK-8法检测细胞增殖 将细胞接种至96孔板,按照1.2.2分组处理24 h,加10 μL CCK-8试剂。再孵育4 h。酶标仪测定450 nm处吸光度值(A值),计算细胞增殖抑制率。

1.2.5 Transwell 检测细胞迁移和侵袭 将各组细胞密度调整为 5×10^4 个/mL。迁移实验:将 Transwell 小室置于 24 孔板,上室加 100 μ L 细胞悬液,下室加培养基 500 μ L。培养 24 h,多聚甲醛固定 25 min,结晶紫染色 15 min。倒置显微镜下观察,随机选取 5 个视野计数细胞。侵袭实验:将 Matrigel 基质胶铺于上室,自然晾干,加细胞悬液 100 μ L,后续操作同迁移实验。

1.2.6 Western blotting 检测细胞中 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达 用 RIPA 试剂提取细胞中总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,置于 Ki-67(1:800)、MMP-2(1:500)、MMP-9(1:500)和 GAPDH(1:1 000)一抗孵育液中,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,再置于山羊抗兔二抗(1:3 000)孵育液中,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。滴加发光试剂,避光显影,曝光拍照。

1.2.7 RT-qPCR 检测细胞中 circ_0136666 和 miR-370 表达 用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,逆转录为 cDNA,进行 PCR 扩增。引物序列:circ_0136666 上游 5'-GGTAAATCGATCTATCGTACT-3',下游 5'-CCGTACAGCTACCATCC-3';GAPDH 上游 5'-GTAGAGTCCTACCTAACGT-3',下游 5'-CAAACATGTATCTCTTGAC-3';miR-370 上游 5'-CGTGAAGTCTCTCGATAAG-3',下游 5'-CTTGTGAGGAGGTCATGT-3';U6 上游 5'-CTTGTCTTCTAACTGACTG-3',下游 5'-CCGTGCACACATATC-GATC-3'。circ_0136666 以 GAPDH 为内参,miR-370 以 U6 为内参,2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算 circ_0136666 和 miR-370 表达。

1.2.8 双荧光素酶报告基因实验 将 A549 细胞接种至 24 孔板,用脂质体法分别将 WT-circ_0136666、MUT-circ_0136666 共转染 miR-370 mimics 或 miR-NC,培养 24 h,收集细胞,参照双荧光素酶活性检测试剂盒操作说明检测荧光素酶活性。

1.3 统计学分析

用 GraphPad Prism 7.0 软件分析实验数据。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,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。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ONY 对 A549 细胞糖酵解的影响 ONY-L 组、ONY-M 组和 ONY-H 组葡萄糖消耗量和乳酸产生

量均较 Con 组显著降低(*P* < 0.05)。(表 1)。

表 1 金粉蕨素对 A549 细胞糖酵解的影响(*n* = 9)

Tab. 1 The effect of onychin on glycolysis of A549 cells (*n* = 9)

组别	葡萄糖消耗量/ (μ mol $\cdot$ L ⁻¹)	乳酸产生量/ (μ mol $\cdot$ L ⁻¹)
Con	51.07 $\pm$ 3.85	38.08 $\pm$ 3.04
ONY-L	39.09 $\pm$ 3.51 [*]	25.94 $\pm$ 2.08 [*]
ONY-M	26.46 $\pm$ 2.22 ^{*#}	18.06 $\pm$ 1.32 ^{*#}
ONY-H	14.53 $\pm$ 1.38 ^{*#&}	11.16 $\pm$ 1.62 ^{*#&}
<i>F</i>	263.960	267.807
<i>P</i>	0.000q	0.000

注:与 Con 组比较,^{*}*P* < 0.05;与 ONY-L 组比较,[#]*P* < 0.05;与 ONY-M 组比较,[&]*P* < 0.05。

Note: Compared with Con group, ^{*}*P* < 0.05; Compared with ONY-L group, [#]*P* < 0.05; Compared with ONY-M group, [&]*P* < 0.05.

2.2 ONY 对 A549 细胞增殖的影响 与 Con 组比较,ONY-L 组、ONY-M 组和 ONY-H 组 A549 细胞增殖抑制明显增强(*P* < 0.05),Ki-67 蛋白表达水平明显降低(*P* < 0.05)(图 1、表 2)。

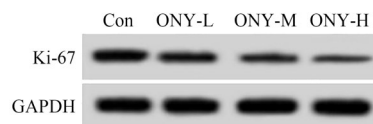


图 1 ONY 作用于 A549 细胞后 Ki-67 蛋白的表达

Fig. 1 The expression of Ki-67 protein in lung cancer A549 cells treated by ONY

表 2 ONY 对 A549 细胞增殖的影响(*n* = 9)

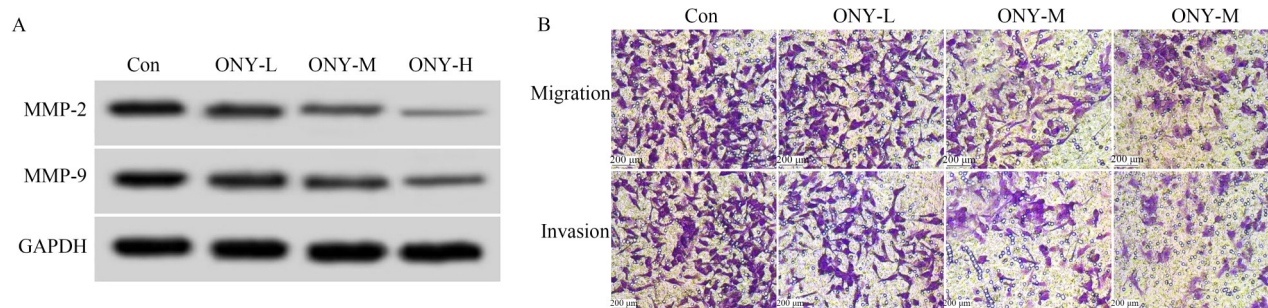
Tab. 2 The effect of ONY on proliferation of A549 cells (*n* = 9)

组别	增殖抑制率/%	Ki-67 蛋白
Con	0.00 $\pm$ 0.00	0.71 $\pm$ 0.05
ONY-L	23.36 $\pm$ 2.36 [*]	0.58 $\pm$ 0.03 [*]
ONY-M	48.51 $\pm$ 4.38 ^{*#}	0.44 $\pm$ 0.04 ^{*#}
ONY-H	61.69 $\pm$ 5.46 ^{*#&}	0.30 $\pm$ 0.02 ^{*#&}
<i>F</i>	493.717	q208.611
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与 Con 组比较,^{*}*P* < 0.05;与 ONY-L 组比较,[#]*P* < 0.05;与 ONY-M 组比较,[&]*P* < 0.05。

Note: Compared with Con group, ^{*}*P* < 0.05; Compared with ONY-L group, [#]*P* < 0.05; Compared with ONY-M group, [&]*P* < 0.05.

2.3 ONY 对 A549 细胞迁移和侵袭的影响 与 Con 组比较,ONY-L 组、ONY-M 组和 ONY-H 组细胞迁移数和侵袭数、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显降低(*P* < 0.05)(图 2、表 3)。



注: (A) ONY 作用于 A549 细胞后 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达; (B) ONY 作用于 A549 细胞后细胞的迁移和侵袭情况。

Note: (A) The expression of MMP-2 and MMP-9 protein in A549 cells after treated by ONY; (B) The migration and invasion of A549 cells after treated by ONY.

图 2 ONY 对 A549 细胞迁移和侵袭的影响

Fig. 2 The effect of ONY on the migration and invasion of A549 cells

表 3 ONY 对 A549 细胞迁移和侵袭的影响 (n=9)

Tab. 3 The effect of ONY on migration and invasion of A549 cells (n=9)

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
Con 组	121.98±10.44	104.21±9.01	0.59±0.05	0.68±0.04
ONY-L 组	94.73±5.71*	88.61±5.36*	0.45±0.03*	0.54±0.05*
ONY-M 组	78.39±4.49*#	69.36±4.59*#	0.29±0.02*#	0.41±0.04*#
ONY-H 组	61.40±5.01*#&	52.85±4.45*#&	0.14±0.02*#&	0.26±0.03*#&
F	128.105	119.730	325.929	175.773
P	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与 Con 组比较, *P<0.05; 与 ONY-L 组比较, #P<0.05; 与 ONY-M 组比较, &P<0.05。

Note: Compared with Con group, *P<0.05; Compared with ONY-L group, #P<0.05; Compared with ONY-M group, &P<0.05.

2.4 ONY 对 A549 细胞中 circ_0136666 和 miR-370 表达的影响 与 Con 组比较, ONY-L 组、ONY-M 组和 ONY-H 组 circ_0136666 表达水平明显降低 (P<0.05), miR-370 表达水平明显升高 (P<0.05) (表 4)。

表 4 ONY 对 A549 细胞中 circ_0136666 和 miR-370 表达的影响 (n=9)

Tab. 4 The effect of ONY on the expression of circ_0136666 and miR-370 in A549 cells (n=9)

组别	circ_0136666	miR-370
Con	1.00±0.07	1.00±0.05
ONY-L	0.77±0.05*	1.61±0.14*
ONY-M	0.62±0.04*#	2.29±0.22*#
ONY-H	0.47±0.04*#&	3.12±0.21*#&
F	173.547	260.785
P	0.000	0.000

注: 与 Con 组比较, *P<0.05; 与 ONY-L 组比较, #P<0.05; 与 ONY-M 组比较, &P<0.05。

Note: Compared with Con group, *P<0.05; Compared with ONY-L group, #P<0.05; Compared with ONY-M group, &P<0.05.

2.5 circ_0136666 靶向调控 miR-370 的表达 circ_0136666 与 miR-370 的结合位点见图 3。miR-370 mimics 与 WT-circ_0136666 共转染后细胞中荧光素酶活性明显降低 (P<0.05), 而 miR-370 mimics 与 MUT-circ_0136666 共转染后细胞中荧光素酶活性无明显变化 (P>0.05) (表 5)。与 pcDNA 组比较, pcDNA-circ_0136666 组 miR-370 表达水平明显降低 [(0.54±0.05) vs. (1.00±0.07), P<0.05]。与 si-NC 组比较, si-circ_0136666 组 miR-370 表达水平明显升高 [(3.36±0.26) vs. (1.02±0.06), P<0.05]。

表 5 双荧光素酶报告基因实验结果 (n=9)

Tab. 5 The results of dual luciferase reporter gene assay (n=9)

组别	WT-circ_0136666	MUT-circ_0136666
miR-NC	1.00±0.06	1.03±0.08
miR-370	0.48±0.04*	1.01±0.05
t	21.633	0.636
P	0.000	0.534

注: 与 miR-NC 组比较, *P<0.05。

Note: Compared with the miR-NC group, *P<0.05.

WT-circ_0136666 5' ggauggaagugcaag AGCAGGaa 3'
miR-370 3' ugguccaaggugggg UCGUCCg 5'
MUT-Circ_0136666 5' ggauggaagugcaag GUAGUAaa 3'

图 3 circ_0136666 与 miR-370 互补的核苷酸序列
Fig. 3 The complementary nucleotide sequence of circ_0136666 and miR-370

2.6 沉默 circ_0136666 对 A549 细胞糖酵解、增殖、迁移和侵袭的影响 与 si-NC 组比较, si-circ_0136666 组葡萄糖消耗量、乳酸产生量明显降低 ($P < 0.05$), 细胞增殖抑制率明显升高 ($P < 0.05$), 细胞迁移和侵袭数、Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$) (图 4、图 5、表 6、表 7)。

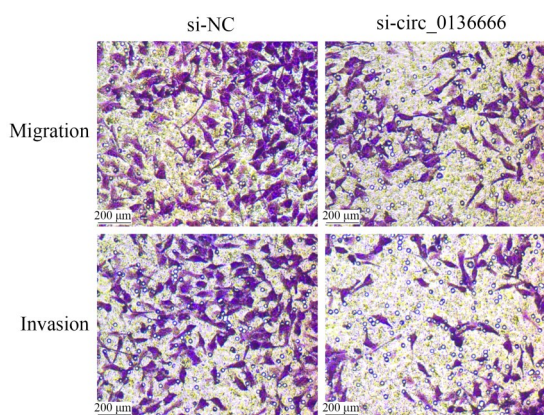


图 4 沉默 circ_0136666 后 A549 细胞的迁移和侵袭
Fig. 4 The migration and invasion of A549 cells after silencing circ_0136666

2.7 过表达 circ_0136666 逆转 ONY 对 A549 细胞糖酵解、增殖、迁移和侵袭的影响 与 ONY+pcDNA 组比较, ONY+pcDNA-circ_0136666 组葡萄糖消耗量和乳酸产生量明显升高 ($P < 0.05$), 细胞增殖抑制率明显降低 ($P < 0.05$), 细胞迁移和侵袭数、Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$) (图 6、图 7、表 8、表 9)。

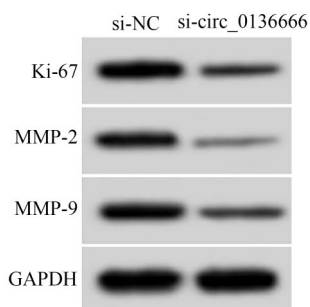


图 5 沉默 circ_0136666 后 A549 细胞中 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达
Fig. 5 The protein expression of Ki-67, MMP-2 and MMP-9 in A549 cells after silencing circ_0136666

3 讨论

肿瘤细胞可在有氧条件下进行糖酵解, 这种代谢方式可增强肿瘤细胞的耐受性, 促进肿瘤的发展^[9]。乳酸的增加为肿瘤细胞提供酸性环境, 有利于其生长和增殖。本研究显示, ONY 可剂量依赖性降低肺癌 A549 细胞的葡萄糖消耗量和乳酸产生量, 与相关报道结果一致^[10], 表明 ONY 可抑制 A549 细胞的糖酵解。肿瘤细胞可无限增殖, 抑制肿瘤细胞增殖是肿瘤治疗的途径之一。Ki-67 参与细胞周期调控, 是肿瘤细胞增殖蛋白^[11]。本研究显示, ONY 可呈剂量依赖性降低 A549 细胞的 Ki-67 蛋白表达水平, 并抑制 A549 细胞增殖。肿瘤细胞迁移和侵袭是肿瘤复发及转移的原因之一, 抑制肿瘤细胞迁移和侵袭可有效降低肿瘤复发和转移的几率^[12], 而 MMP-2、MMP-9 可促进细胞迁移和侵袭^[13]。本研究显示, ONY 可降低 A549 细胞的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平, 抑制其迁移和侵袭。这些结果表明, ONY 具有抗肺癌作用, 可能是肺癌的潜在治疗药物。

circ_0136666 是新发现的 circRNA, 与多种肿瘤的发生发展有关: 如 circ_0136666 在乳腺癌组织中

表 6 沉默 circ_0136666 对 A549 细胞糖酵解、增殖、迁移和侵袭的影响 ($n=9$)

Tab. 6 The effect of silencing circ_0136666 on the glycolysis, proliferation, migration and invasion of A549 cells ($n=9$)

组别	circ_0136666	miR-370	葡萄糖消耗量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	乳酸产生量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	增殖 抑制率/%	迁移细胞数	侵袭细胞数
si-NC	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.06	54.50 $\pm$ 5.25	39.37 $\pm$ 2.91	5.52 $\pm$ 0.51	126.95 $\pm$ 10.83	107.53 $\pm$ 7.57
si-circ_0136666	0.34 $\pm$ 0.03*	2.69 $\pm$ 0.22*	18.66 $\pm$ 1.74*	14.53 $\pm$ 1.28*	49.23 $\pm$ 4.29*	69.66 $\pm$ 5.22*	61.48 $\pm$ 5.51*
<i>t</i>	25.999	22.233	19.440	23.441	30.353	14.296	14.755
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与 si-NC 组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with si-NC group, * $P < 0.05$.

表 7 沉默 circ_0136666 对 A549 细胞中 Ki-67、MMP-2 和 MMP-2 蛋白表达的影响 (n=9)

Tab. 7 The effects of silencing circ_0136666 on the protein expression of Ki-67, MMP-2 and MMP-2 in A549 cells (n=9)

组别	Ki-67 蛋白	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
si-NC	0.74±0.06	0.57±0.04	0.69±0.06
si-circ_0136666	0.37±0.03*	0.21±0.02*	0.32±0.02*
<i>t</i>	16.547	24.150	17.551
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

注:与 si-NC 组比较, **P*<0.05。

Note: Compared with si-NC group, **P*<0.05.

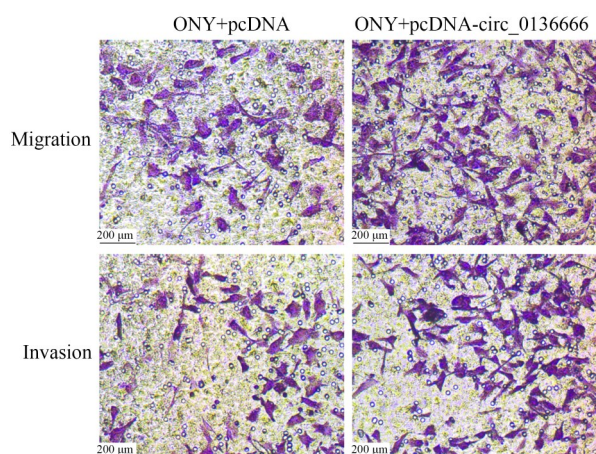


图 6 过表达 circ_0136666 逆转 ONY 对 A549 细胞迁移和侵袭的影响

Fig. 6 Over-expression of circ_0136666 reversed the effect of ONY on the migration and invasion of A549 cells

表达上调,可通过靶向结合 miR-1299 上调 CDK6,促进乳腺癌的发展进程^[14];circ_0136666 在结肠癌组织和细胞中表达上调,沉默其表达可通过靶向负调控 miR-136 下调 SH2B1,抑制结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭,并使细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期^[15]。但目前,

表 8 过表达 circ_0136666 逆转 ONY 对 A549 细胞糖酵解、增殖、迁移和侵袭的影响 (n=9)

Tab. 8 Over-expression of circ_0136666 reversed the effect of ONY on the glycolysis, proliferation, migration and invasion of A549 cells (n=9)

组别	circ_0136666	miR-370	葡萄糖消耗量/ (μmol·L ⁻¹)	乳酸产生量/ (μmol·L ⁻¹)	增殖 抑制率/%	迁移细胞数	侵袭细胞数
ONY+pcDNA	1.00±0.06	1.00±0.07	13.39±1.14	10.59±1.08	63.28±5.46	60.58±5.47	51.24±3.71
ONY+pcDNA-circ_0136666	2.67±0.24*	0.42±0.04*	29.89±2.11*	26.88±2.22*	22.47±2.15*	107.07±8.83*	89.67±6.85*
<i>t</i>	20.252	21.582	20.640	19.795	20.864	13.427	14.799
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 ONY+pcDNA 组比较, **P*<0.05。

Note: Compared with ONY+pcDNA group, **P*<0.05.

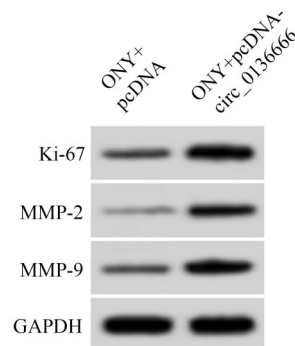


图 7 ONY 作用于过表达 circ_0136666 的 A549 细胞后 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达

Fig. 7 The effects of ONY on the protein expressions of Ki-67, MMP-2 and MMP-9 in A549 cells circ_0136666 overexpressed

还未见 circ_0136666 调控肺癌细胞恶性生物学行为的相关报道。本研究显示,沉默 circ_0136666 可抑制 A549 细胞的糖酵解、增殖、迁移和侵袭,提示 circ_0136666 在肺癌发生发展中发挥促癌基因作用,可能是肺癌治疗的潜在分子靶点。本研究还显示,ONY 可剂量依赖性抑制 A549 细胞中 circ_0136666 的表达,而过表达 circ_0136666 可逆转 ONY 对 A549 细胞糖酵解、增殖、迁移和侵袭的作用,提示 ONY 可下调 circ_0136666,发挥抗肺癌作用。

circRNA 可与 miRNA 靶向结合并负调控其表达,两者共同影响肿瘤的发生发展。miR-370 在肿瘤中表达下调,如 miR-370 在乳腺癌组织中表达下调,上调其表达可抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,促进细胞凋亡,并通过靶向抑制 SOX12 表达发挥抗肿瘤作用,为乳腺癌治疗提供了新的潜在靶标^[16]。Wang 等^[17]研究显示,miR-370 在肝细胞癌细胞和组织中表达水平降低,过表达 miR-370 可通过下调 BEX2/MAPK/JNK 信号通路抑制肝细胞癌细胞

表 9 过表达 circ_0136666 逆转 ONY 对 A549 细胞中 Ki-67、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响 (n=9)

Tab. 9 Over-expression of circ_0136666 reversed the effect of ONY on the protein expression of Ki-67, MMP-2 and MMP-9 in A549 cells (n=9)

组别	Ki-67 蛋白	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
ONY+pcDNA	0.29±0.02	0.13±0.02	0.25±0.02
ONY+pcDNA-circ_0136666	0.60±0.05*	0.48±0.04*	0.57±0.04*
t	17.270	23.479	21.466
P	0.000	0.000	0.000

注:与 ONY+pcDNA 组比较, *P<0.05。

Note: Compared with ONY+pcDNA group, *P<0.05.

增殖和侵袭。本研究证实, circ_0136666 可与 miR-370 靶向结合, 且沉默 circ_0136666 可促进 A549 细胞中 miR-370 的表达, 而过表达 circ_0136666 则可抑制 miR-370 的表达, 说明 circ_0136666 可靶向结合 miR-370 并负调控其表达, 与本文 ONY 抑制 A549 细胞中 circ_0136666 表达, 并促进 miR-370 表达的结果一致。本研究还显示, 过表达 circ_0136666 可下调经 ONY 处理的 A549 细胞中 miR-370 的表达, 进一步提示 ONY 可通过调控 circ_0136666/miR-370 轴抑制肺癌的发展进程。

综上所述, ONY 可有效抑制肺癌 A549 细胞的糖酵解过程及增殖、迁移和侵袭能力, 可能是通过调控 circ_0136666/miR-370 轴发挥作用, 具有开发为肺癌治疗药物的潜在价值。

参考文献

- [1] 赵艺, 任珏辉, 万莹. 长链非编码 RNA RP11-739N20.2 对肺癌细胞增殖和侵袭迁移的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2020, 25(5): 393-398. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0460.2020.05.002.
- [2] 和莹莹, 薛金慧, 赵娜. 大黄酸对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(2): 302-308. DOI: 10.13481/j.1671-587x.20200216.
- [3] 白军, 杨春, 唐敏, 等. 金粉蕨素体外诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的机制[J]. 肿瘤药, 2014, 4(3): 176-181. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2014.035.
- [4] WANG J, KONG J Y, NIE Z, et al. Circular RNA Hsa_circ_0066755 as an oncogene via sponging miR-651 and as a promising diagnostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma[J]. Int J Med Sci, 2020, 17(11): 1499-1507. DOI: 10.7150/ijms.47024.
- [5] XU W G, ZHOU B, WU J, et al. Circular RNA hsa-circ-0007766 modulates the progression of gastric carcinoma via miR-1233-3p/GDF15 axis[J]. Int J Med Sci, 2020, 17(11): 1569-1583. DOI: 10.7150/ijms.46261.

- [6] ZHANG C, ZHOU H B, YUAN K Z, et al. Overexpression of hsa_circ_0136666 predicts poor prognosis and initiates osteosarcoma tumorigenesis through miR-593-3p/ZEB2 pathway[J]. Aging, 2020, 12(11): 10488-10496. DOI: 10.18632/aging.103273.
- [7] PENG J, CHEN X L, CHENG H Z, et al. Silencing of KCNK15-AS1 inhibits lung cancer cell proliferation via up-regulation of miR-202 and miR-370[J]. Oncol Lett, 2019, 18(6): 5968-5976. DOI: 10.3892/ol.2019.10944.
- [8] NING Y X, BAI J. Mechanism of induction apoptosis of Onychin in ovarian cells *in vitro* [J]. Chin Ger J Clin Oncol, 2013, 12(8): 389-392. DOI: 10.1007/s10330-013-1204-0.
- [9] SHANGGUAN H, FENG H, LV D X, et al. Circular RNA circ-SLC25A16 contributes to the glycolysis of non-small-cell lung cancer through epigenetic modification[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(6): 437. DOI: 10.1038/s41419-020-2635-5.
- [10] 刘冬, 赵鹏, 王磊, 等. 蒲公英萜醇对肺癌细胞的增殖及糖酵解的影响[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(3): 465-471. DOI: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.03.001.
- [11] WYSOCKA J, ADAMCZYK A, KRUCZAK A, et al. High Ki-67 expression is a marker of poor survival in apocrine breast carcinoma [J]. Pol J Pathol, 2020, 71(2): 107-119. DOI: 10.5114/pjp.2020.97018.
- [12] LI F, WANG X F, YANG L L. microRNA-147 targets BDNF to inhibit cell proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer [J]. Oncol Lett, 2020, 20(2): 1931-1937. DOI: 10.3892/ol.2020.11715.
- [13] ZHU L M, LI N. Downregulation of long noncoding RNA TUSC7 promoted cell growth, invasion and migration through sponging with miR-616-5p/GSK3β pathway in ovarian cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(13): 7253-7265. DOI: 10.26355/eurrev_202007_21880.
- [14] LIU L H, TIAN Q Q, LIU J, et al. Upregulation of hsa_circ_0136666 contributes to breast cancer progression by sponging miR-1299 and targeting CDK6 [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 12684-12693. DOI: 10.1002/jcb.28536.
- [15] JIN C H, WANG A H, LIU L B, et al. Hsa_circ_0136666 promotes the proliferation and invasion of colorectal cancer through miR-136/SH2B1 axis [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 7247-7256. DOI: 10.1002/jcp.27482.
- [16] WANG Y, MA D L, YU C H, et al. microRNA-370 suppresses SOX12 transcription and acts as a tumor suppressor in bladder cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(5): 2303-2312. DOI: 10.26355/eurrev_202003_20496.
- [17] WANG X, ZHU W Y, XU C S, et al. microRNA-370 functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma via inhibition of the MAPK/JNK signaling pathway by targeting BEX2 [J]. J Hum Genet, 2019, 64(12): 1203-1217. DOI: 10.1038/s10038-019-0653-x.

校稿: 李征 王娟

本文引用格式: 张洪岩, 朱宝杰, 范宜锋, 等. 金粉蕨素通过 circ_0136666/miR-370 轴对肺癌 A549 细胞糖酵解、增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 肿瘤药, 2022, 12(6): 745-751. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.06.10.

Cite this article as: ZHANG Hongyan, ZHU Baojie, FAN Yifeng, et al. Effects of onychin on the glycolysis, proliferation, migration and invasion of lung cancer A549 cells via circ_0136666/miR-370 axis [J]. Anti-tumor Pharmacy, 2022, 12(6): 745-751. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.06.10.