

薛飞,董传莹,田莉,等. 芦荟大黄素调控 miR-30b 促进子宫内膜癌细胞自噬的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 61-67.

Xue F, Dong CY, Tian L, et al. Aloe emodin regulates miR-30b to promote autophagy in endometrial cancer cells [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 61-67.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.010

芦荟大黄素调控 miR-30b 促进子宫内膜癌细胞自噬的研究

薛飞*, 董传莹, 田莉, 张春瑞

(郑州澍青医学高等专科学校临床医学系, 郑州 450000)

【摘要】 目的 探讨芦荟大黄素(AE)调控子宫内膜癌细胞 HEC-1-B 中 miR-30b 表达促进细胞自噬的作用机制。方法 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 miR-30b 在正常子宫内膜细胞和不同子宫内膜癌细胞株 HEC-1-A、HEC-1-B、RL95-2 中的表达水平。取 miR-30b 表达水平最高的 HEC-1-B 癌细胞分为 HEC-1-B 癌细胞组、miR-30b inhibitor NC 组(转染 miR-30b inhibitor NC)、miR-30b inhibitor 组(转染 miR-30b inhibitor)以及 AE 组(30 μmol/L AE, 未转染)和 AE+转染组; AE+miR-30b mimics NC 组(30 μmol/L AE, 转染 miR-30b mimics NC)、AE+miR-30b mimics 组(30 μmol/L AE, 转染 miR-30b mimics)。qRT-PCR 法检测各组细胞 miR-30b 表达水平; CCK-8 法检测各组细胞增殖活性; 流式细胞术检测各组细胞凋亡率; 单丹磺酰尸胺(MDC)荧光染色法检测各组细胞自噬率; 蛋白免疫印迹法(Western blot)法检测各组细胞自噬相关蛋白 Beclin1、LC3-I、LC3-II 和 p62 表达水平。结果 与人正常子宫内膜上皮细胞相比, HEC-1-A、HEC-1-B 和 RL95-2 癌细胞中 miR-30b 表达水平显著升高($P < 0.05$)。其中 HEC-1-B 癌细胞中 miR-30b 表达水平最高, 所以后续将选择 HEC-1-B 癌细胞进行转染实验。与 HEC-1-B 癌细胞组和 miR-30b inhibitor NC 组相比, miR-30b inhibitor 组癌细胞 miR-30b 表达水平、细胞增殖率以及 p62 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$), 细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著升高($P < 0.05$)。与 HEC-1-B 癌细胞组相比, AE 组和 AE+miR-30b mimics NC 组癌细胞 miR-30b 表达水平、细胞增殖率以及 p62 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$), 细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著升高($P < 0.05$)。与 AE+miR-30b mimics NC 组相比, AE+miR-30b mimics 组癌细胞 miR-30b 表达水平、细胞增殖率以及 p62 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$), 细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著降低($P < 0.05$)。结论 子宫内膜癌细胞中 miR-30b 表达较高, AE 可能通过抑制 miR-30b 表达, 促进癌细胞自噬和凋亡, 抑制癌细胞增殖, 而过表达 miR-30b 可逆转 AE 发挥的作用。

【关键词】 芦荟大黄素; miR-30b; 子宫内膜癌细胞; 自噬; 增殖; 凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0061-07

Aloe emodin regulates miR-30b to promote autophagy in endometrial cancer cells

XUE Fei*, DONG Chuanying, TIAN Li, ZHANG Chunrui

(Department of Clinical Medicine, Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of aloe emodin (AE) in promoting autophagy by regulating miR-30b expression in endometrial carcinoma cell line HEC-1-B. **Methods** The expression level of miR-30b in normal

[基金项目] 河南省高等学校重点科研项目(16B320028)。

[作者简介] 薛飞(1986—),男,本科,讲师,研究方向:普通外科。E-mail: xfsqoffice@163.com

endometrial cells and endometrial cancer cell lines HEC-1-A, HEC-1-B, and RL95-2 was measured by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). HEC-1-B cancer cells with the highest expression level of miR-30b were divided into a HEC-1-B cancer cell group, miR-30b inhibitor NC group (transfected with miR-30b inhibitor NC), miR-30b inhibitor group (transfected with miR-30b inhibitor), AE group (30 $\mu\text{mol/L}$ AE, untransfected), AE+transfection group: AE+miR-30b mimics NC group (30 $\mu\text{mol/L}$ AE, transfected with miR-30b mimics NC), and AE+miR-30b mimics group (30 $\mu\text{mol/L}$ AE, transfected with miR-30b mimics). The expression level of miR-30b, cell proliferation, apoptosis rate, and autophagy rate were determined by qRT-PCR, CCK-8 assays, flow cytometry, and monodansulfonyl cadaverine fluorescence staining respectively. Western blot was used to measure the protein expression levels of Beclin 1, LC3-I, LC3-II, and p62. **Results** Compared with normal human endometrial epithelial cells, expression levels of miR-30b were significantly higher in HEC-1-A, HEC-1-B, and RL95-2 cancer cells ($P < 0.05$). The expression level of miR-30b was the highest in HEC-1-B cancer cells. Thus, HEC-1-B cancer cells were selected for transfection experiments. Compared with HEC-1-B cancer cell and miR-30b inhibitor NC groups, the miR-30b inhibitor group had a significantly lower miR-30b expression level, cell proliferation rate, and p62 protein expression level ($P < 0.05$), and significantly higher apoptosis rate, autophagy rate, Beclin 1 protein expression level, and LC3-II/I ratio ($P < 0.05$). Compared with the HEC-1-B group, AE and AE+miR-30b mimics NC groups had significantly lower miR-30b expression levels, cell proliferation rates and p62 protein expression levels ($P < 0.05$), and a significantly higher apoptosis rate, autophagy rate, Beclin 1 protein expression level, and LC3-II/I ratio ($P < 0.05$). Compared with the AE+miR-30b mimics NC group, the AE+miR-30b mimics group had a significantly higher miR-30b expression level, cell proliferation rate, and p62 protein expression level ($P < 0.05$), and significantly lower apoptosis rate, autophagy rate, Beclin 1 protein expression level, and LC3-II/I ratio ($P < 0.05$). **Conclusions** Expression of miR-30b is high in endometrial carcinoma cells. AE may inhibit the expression of miR-30b, promote autophagy and apoptosis of cancer cells, and inhibit the proliferation of cancer cells. Overexpression of miR-30b reverses the effect of AE.

【Keywords】 aloe emodin; miR-30b; endometrial cancer cells; autophagy; proliferation; apoptosis

子宫内膜癌是来源于子宫内膜上皮细胞的恶性肿瘤,近年来,其发病率和死亡率持续上升,约占女性生殖道恶性肿瘤的 20%~30%,早期患者多为局限性病变,以手术治疗为主,但因早期常忽略不规则阴道排液和流血现象,易失去早期诊断的机会,而晚期及复发性患者的治疗以放化疗为主的综合性治疗^[1]。芦荟大黄素(aloe emodin, AE)是一种天然的蒽醌衍生物,可从芦荟中提取,具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、神经保护和肝保护等作用^[2]。研究发现,AE 不但能够诱导非小细胞肺癌的自噬和凋亡^[3],还能通过激活人胰腺癌细胞凋亡和自噬相关通路,破坏癌细胞线粒体膜电位,具有明显的抑癌作用^[4]。另有研究发现 AE 通过上调 miR-133 表达减轻心肌梗死和心肌细胞凋亡^[5]。而 miRNAs 是在真核生物中发现的长度约为 19~25 个核苷酸的非编码小 RNA,在转录后基因的表达调控中起重要作用^[6],其中,miR-30b 过表达可降低自噬相关标记基因的表达且直接靶向 Beclin1 基因^[7]。而 Beclin1 是第一个在哺乳动物中发现的与自噬相关的抑癌基因,是调控细胞自噬活性的关键靶点^[8]。但是,目前 AE 调控 miR-30b 对子宫内膜癌细胞自噬的研究尚未见报道。因此,本研究通过上调或抑制子宫内

膜癌细胞 HEC-1-B 中 miR-30b 表达,并使用 AE 培养该细胞,观察其对细胞生长及自噬的影响,旨在揭示 AE 调控 miR-30b 促进 HEC-1-B 癌细胞自噬的作用机制,为子宫内膜癌的治疗提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 细胞

人子宫内膜腺癌细胞株 HEC-1-A (目录号: TCHu149)、HEC-1-B (目录号: TCHu115)、RL95-2 (目录号: TCHu198)均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;人正常子宫内膜上皮细胞株由南方医科大学实验室赠与。

1.2 主要试剂与仪器

AE (纯度: HPLC $\geq 98\%$, 规格: 每瓶 20 mg, 货号: SA8200)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号: PC0020)和 ECL 显色试剂盒(货号: SW2040)均购自北京索莱宝生物科技有限公司;胰蛋白酶(货号: 27250018)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS; 货号: 16140071)和 RPIM-1640 培养基(货号: 72400120)均购自美国 Gibco 公司;细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8; 货号: CK04)购自上海复申生物科技有限公司;96 孔板(货号: F600418)购自上海

生工生物工程有限公司;RNA 提取试剂盒(货号:DP431)购自北京天根生化科技有限公司;逆转录试剂盒(货号:QP056)购自美国 Genecopoeia 公司;miR-30b、U6 引物以及 miR-30b 模拟物(miR-30b mimics)、miR-30b 模拟物阴性对照(miR-30b mimics NC)、miR-30b 抑制物(miR-30b inhibitor)、miR-30b 抑制物阴性对照(miR-30b inhibitor NC)均由上海生工生物科技有限公司合成;蛋白 marker(货号:B2787-1VL)、 β -actin 鼠抗(货号:AB1970-100UL)和 PVDF 膜(货号:3010040001)均购自美国 Sigma 公司;AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(货号:LHK601-020)购自嘉美生物技术有限公司;Lipofectamine 3000 转染试剂盒(货号:L3000015)购自美国 Invitrogen 公司;单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverin, MDC)荧光检测试剂盒(货号:KFS305)购自北京百奥莱博科技有限公司;Beclin1 兔多克隆抗体(货号:ab62557)、p62 兔单克隆抗体(货号:ab211324)、LC3-II 和 LC3-I 兔单克隆抗体(货号:ab221794)以及辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 二抗(货号:ab150077)均购自美国 Abcam 公司;酶标仪 Fax-20100 购自美国 INStat 公司;尼康 SMZ745 光学显微镜购自于上海普赫生物科技有限公司;FACSCanto 流式细胞仪购自美国 Beckman 公司;徕卡倒置荧光显微镜 DMILED 购自上海成贯仪器有限公司;全能型凝胶成像分析系统 ChemiDoc-MP 购自山东三瑞科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

分别将各个细胞株接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,放于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,每 2~3 d 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,使细胞呈单层贴壁生长。

1.3.2 qRT-PCR 检测正常子宫内膜细胞和子宫内膜癌细胞中 miR-30b 表达水平

使用 RNA 提取试剂盒分别提取正常子宫内膜细胞和子宫内膜癌细胞 HEC-1-A、HEC-1-B、RL95-2 细胞株的总 RNA,逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板,按照 qRT-PCR 试剂盒说明书配置 PCR 反应体系:2×SYBR mix 10 μ L, H₂O 8 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,10×cDNA 模板 1 μ L。反应条件设定为:94℃ 预变性 5 min、94℃ 变性 15 s、55℃ 退火 50 s、35 个循环、72℃ 延伸 10 min。以 U6 为内参,根据 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 算法,计算 miR-30b 表达水平。

miR-30b 和 U6 引物序列见表 1。

1.3.3 细胞转染与分组

HEC-1-B 癌细胞随机分为 HEC-1-B 癌细胞组(正常培养,未转染)、miR-30b inhibitor NC 组(正常培养,转染 miR-30b inhibitor NC)、miR-30b inhibitor(正常培养,转染 miR-30b inhibitor)以及 AE 组(含终浓度为 30 μ mol/L AE 培养^[9],未转染)、AE+miR-30b mimics NC 组(含终浓度为 30 μ mol/L AE 培养,转染 miR-30b mimics NC)、AE+miR-30b mimics 组(含终浓度为 30 μ mol/L AE 培养,转染 miR-30b mimics),当 HEC-1-B 癌细胞生长密度达 50%~60% 时,使用 Lipofectamine 3000 转染试剂盒转染细胞后分别进行正常培养或使用含终浓度为 30 μ mol/L AE 培养,各组细胞继续培养 24 h 后,检测各项指标。

1.3.4 CCK-8 法检测各组细胞增殖活性

收集各组细胞,调整细胞浓度为每毫升 1×10⁵ 个,每孔接种 100 μ L 至 96 孔板中,空白孔加入 100 μ L 培养基,在 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁,加入浓度为 10% 的 CCK-8 溶液,继续培养 2 h 后,于酶标仪上检测各孔在 450 nm 波长下的 OD 值。每组各设 6 个复孔。细胞增殖率(%)=(实验组 OD_{450nm}-空白组 OD_{450nm})/(对照组 OD_{450nm}-空白组 OD_{450nm})。

1.3.5 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

收集转染或培养 24 h 后的各组细胞,1200 r/min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 400 μ L 结合缓冲液悬浮细胞,再加入 5 μ L Annexin V 染液,轻轻混匀后于 2℃~8℃ 下避光孵育 15 min,然后加入 10 μ L PI 轻轻混匀,再次于 2℃~8℃ 避光孵育 5 min,上流式细胞仪检测细胞凋亡率,每组重复 6 次。

1.3.6 MDC 试剂盒检测各组细胞自噬率

取转染或培养 24 h 后的各组细胞,每组设置 6 个复孔重复,每孔取 2 mL 细胞悬液,800 r/min 离心 5 min,弃上清,1×Wash buffer 清洗细胞 1 次并重悬

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences

引物名称 Name	序列(5'-3') Sequence
miR-30b	F:AGTCTATACAAGGCAAGCTCTC R:CCCAATACGACCAATCCGTT
U6	F:CTCGTTCCGACGACACA R:AACGCTTCACGAATTGCGT

细胞,调整浓度为每毫升 1×10^5 个,各取 90 μL 细胞悬液至新的 EP 管中,加入 10 μL MDC 染液,轻轻混匀,室温避光孵育 30 min,然后 800 r/min 离心 5 min,弃上清,1 \times Wash buffer 清洗细胞 2 次后,加入 100 μL collection buffer 重悬细胞滴加于载玻片上,盖上盖玻片,于荧光显微镜下观察(激发波长 355 nm,阻断波长 512 nm)并计数 MDC 阳性细胞(核周和胞浆出现高密度着色点),以 MDC 阳性细胞率表示细胞自噬率。

1.3.7 Western blot 法检测各组细胞中自噬相关蛋白表达水平

收集转染或培养 24 h 后的各组细胞,采用蛋白抽提试剂盒提取各组细胞总蛋白,使用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白进行定量,依次进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转 PVDF 膜、5%脱脂奶粉封闭、1:2000 浓度稀释后的 Beclin1、p62、LC3-II 和 LC3-I 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育、置于含辣根过氧化物酶缀合的二抗 (1:5000) 中室温孵育 2 h、洗膜,用 ECL 试剂盒显色,全能型凝胶成像分析系统拍照,以 β -actin 为内参,分析各组蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

本研究所得数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 GraphPad Prism 7.0 软件绘制条形图,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验;当 $P < 0.05$ 时,代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-30b 在正常子宫内膜细胞和不同子宫内膜癌细胞株中的表达

与人正常子宫内膜上皮细胞 (1.00 ± 0.00) 相比,HEC-1-A、HEC-1-B 和 RL95-2 癌细胞中 miR-30b 表达水平分别为 (1.87 ± 0.19)、(2.14 ± 0.22)、(1.69 ± 0.17) 均显著升高 ($P < 0.05$)。其中 HEC-1-B 癌细胞中 miR-30b 表达水平最高,所以后续将选择 HEC-1-B 癌细胞进行转染实验。

2.2 抑制 miR-30b 对 HEC-1-B 癌细胞增殖、凋亡及自噬的影响

与 HEC-1-B 癌细胞组和 miR-30b inhibitor NC 组相比,miR-30b inhibitor 组癌细胞 miR-30b 表达水平、细胞增殖率以及 p62 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$),细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著升高 ($P < 0.05$)。见

图 1、图 2。

2.3 AE 对 HEC-1-B 癌细胞 miR-30b 表达水平的影响

与 HEC-1-B 癌细胞组 (1.00 ± 0.00) 相比,AE 组 (0.32 ± 0.04) 和 AE+miR-30b mimics NC 组 (0.35 ± 0.05) 癌细胞中 miR-30b 表达水平显著降低 ($P < 0.05$);与 AE+miR-30b mimics NC 组相比,AE+miR-30b mimics 组 (1.17 ± 0.12) 癌细胞中 miR-30b 表达水平显著升高 ($n=6, P < 0.05$)。

2.4 AE 对 HEC-1-B 癌细胞增殖活性和凋亡的影响

与 HEC-1-B 癌细胞组相比,AE 组和 AE+miR-30b mimics NC 组癌细胞增殖率显著降低,细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$);与 AE+miR-30b mimics NC 组相比,AE+miR-30b mimics 组癌细胞增殖率显著升高,细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。见图 3、图 4。

2.5 AE 对 HEC-1-B 癌细胞自噬率的影响

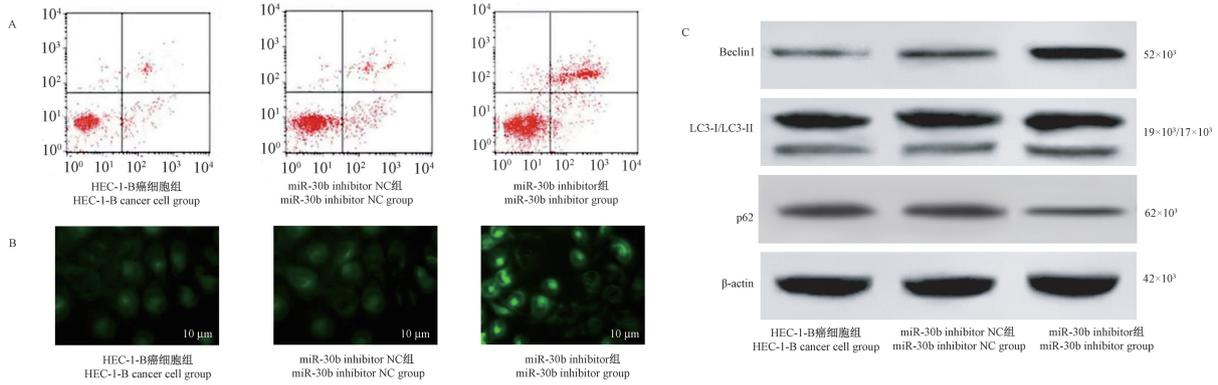
与 HEC-1-B 癌细胞组 (2.26 ± 0.29)% 相比,AE 组 (24.57 ± 2.51)% 和 AE+miR-30b mimics NC 组 (29.22 ± 3.20)% 癌细胞自噬率显著升高 ($P < 0.05$);与 AE+miR-30b mimics NC 组相比,AE+miR-30b mimics 组 (15.19 ± 1.71)% 癌细胞自噬率显著降低 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.6 AE 对 HEC-1-B 癌细胞自噬相关蛋白表达水平的影响

与 HEC-1-B 癌细胞组相比,AE 组和 AE+miR-30b mimics NC 组癌细胞 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著升高,p62 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。与 AE+miR-30b mimics NC 组相比,AE+miR-30b mimics 组癌细胞 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著降低,p62 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。见图 6、图 7。

3 讨论

子宫内膜癌好发于围绝经期与绝经后妇女,目前早期患者的 5 年生存率可达 80%~90%,但晚期患者预后较差,5 年生存率仅为 5%,确切病因仍不清楚,临床观察发现可能与雌激素对子宫内膜的长期持续刺激有关,还可能与子宫内膜增生、不育、晚绝经、家族史等有关^[10],其发病机制也较为复杂。因此探究子宫内膜癌具体发病机制对其后期治疗至关重要。本研究发现,与正常子宫内膜上皮细胞

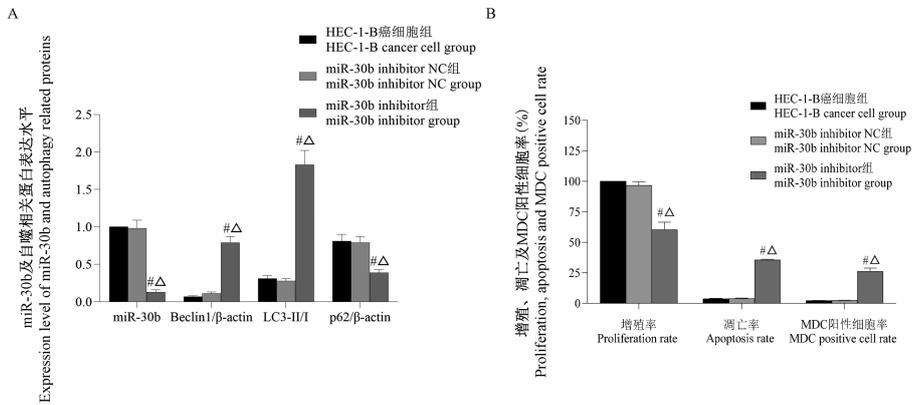


注:A:细胞凋亡检测图;B:细胞自噬小体荧光图;C:Western blot 检测自噬相关蛋白。

图 1 各组癌细胞增殖、凋亡及自噬比较

Note. A, Apoptosis detection chart. B, Autophagy body fluorescence diagram. C, Western blot analysis of autophagy related proteins.

Figure 1 Comparison of proliferation, apoptosis and autophagy of cancer cells in each group

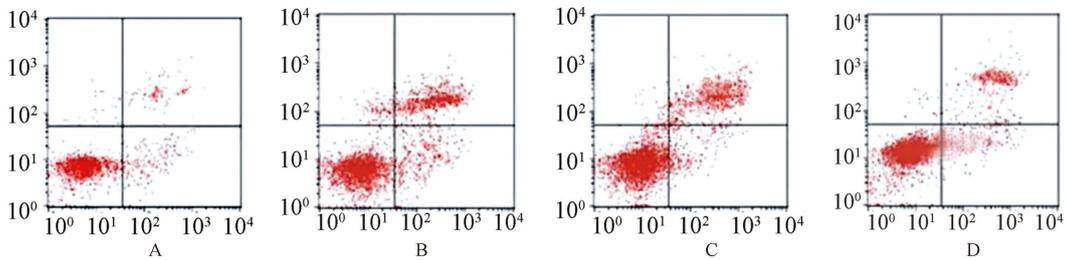


注:A:miR-30b 及自噬相关蛋白表达水平;B:增殖、凋亡及 MDC 阳性细胞率。与 HEC-1-B cancer cell 组相比, # $P < 0.05$; 与 miR-30b inhibitor NC 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

图 2 各组 HEC-1-B 癌细胞增殖凋亡及自噬比较

Note. A, Expression level of miR-30b and autophagy related proteins. B, Proliferation, apoptosis and MDC positive cell rate. Compared with HEC-1-B cancer cell group, # $P < 0.05$. Compared with miR-30b inhibitor NC group, $\Delta P < 0.05$.

Figure 2 Comparison of proliferation, apoptosis and autophagy of HEC-1-B cancer cells in each group



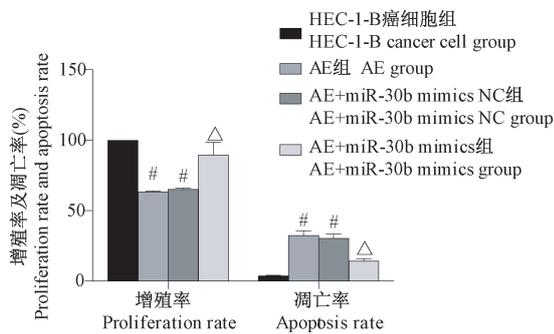
注:A:HEC-1-B 癌细胞组;B:AE 组;C:AE+miR-30b mimics NC 组;D:AE+miR-30b mimics 组。

图 3 各组细胞凋亡情况检测结果

Note. A, HEC-1-B cancer cell group. B, AE group. C, AE+miR-30b mimics NC group. D, AE+miR-30b mimics group.

Figure 3 Detection results of apoptosis in each group.

相比,不同子宫内膜癌细胞株 HEC-1-A、HEC-1-B 和 RL95-2 中 miR-30b 表达水平均显著升高,其中 HEC-1-B 癌细胞中 miR-30b 表达水平最高。

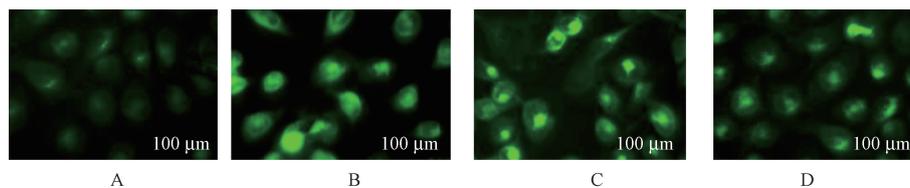


注:与 HEC-1-B 癌细胞组相比, $^{\#}P < 0.05$; 与 AE+miR-30b mimics NC 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图 4 各组 HEC-1-B 癌细胞增殖率和凋亡率比较

Note. Compared with HEC-1-B cancer cell group, $^{\#}P < 0.05$. Compared with AE+miR-30b mimics NC group, $^{\Delta}P < 0.05$.

Figure 4 The ratio of proliferation rate and apoptosis rate of HEC-1-B cancer cells in each group

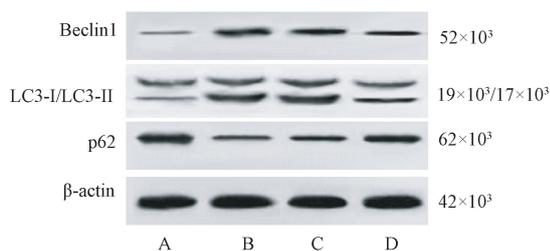


注:A:HEC-1-B 癌细胞组;B:AE 组;C:AE+miR-30b mimics NC 组;D:AE+miR-30b mimics 组。

图 5 各组 HEC-1-B 癌细胞自噬小体荧光图

Note. A, HEC-1-B cancer cell group. B, AE group. C, AE+miR-30b mimics NC group. D, AE+miR-30b mimics group.

Figure 5 Fluorescence of autophagy bodies of HEC-1-B cancer cells in each group



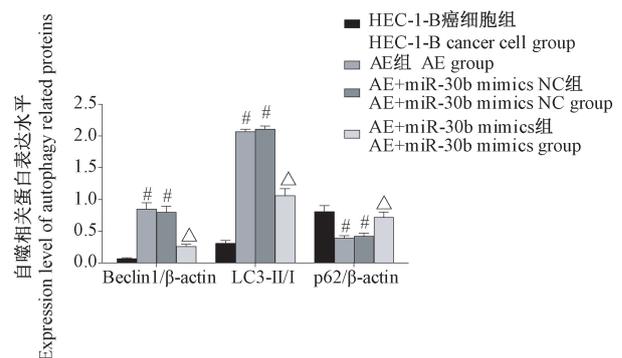
注:A:HEC-1-B 癌细胞组;B:AE 组;C:AE+miR-30b mimics NC 组;D:AE+miR-30b mimics 组。

图 6 各组 HEC-1-B 癌细胞自噬相关蛋白表达 Western blot 图

Note. A, HEC-1-B cancer cell group. B, AE group. C, AE+miR-30b mimics NC group. D, AE+miR-30b mimics group.

Figure 6 Expression of autophagy related proteins in HEC-1-B cancer cells of each group by Western blot

AE 为大黄中有效抗菌成分,在多种人类癌细胞系中具有抗癌特性,包括抑制癌细胞增殖、迁移和侵袭,诱导细胞周期阻滞和细胞死亡,调节免疫信号等^[11]。除本身具有的抗肿瘤作用外,还可提高肿瘤对放疗、化疗的敏感性^[12]。另外刘豪杰等^[13]研究发现,AE 可通过提高胃癌细胞自噬,诱导细胞凋亡,Gao 等^[14]研究发现 AE 可诱导宫颈癌细胞凋亡。而诱导癌细胞自噬和凋亡可发挥抗子宫内膜癌的作用^[15]。其中自噬蛋白 Beclin1 表达水平及 LC3-II/I 比值可用于反映自噬程度,而自噬溶酶体降解底物 p62 表达的增加与自噬水平呈反相关^[16]。本研究发现,AE 可显著降低 HEC-1-B 癌细胞中 miR-30b 表达水平、细胞增殖率以及 p62 蛋白表达水平,显著提高细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值,提示 AE 可能通过促进 HEC-1-B 癌细胞自噬,进一步促进其凋亡,抑制其增殖,但是否调控 miR-30b 尚需进一步研究。



注:与 HEC-1-B 癌细胞组相比, $^{\#}P < 0.05$; 与 AE+miR-30b mimics NC 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图 7 各组 HEC-1-B 癌细胞中 Beclin1、p62 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值比较

Note. Compared with HEC-1-B cancer cell group, $^{\#}P < 0.05$. Compared with AE+miR-30b mimics NC group, $^{\Delta}P < 0.05$.

Figure 7 Comparison of Beclin1 and p62 protein expression levels and LC3-II/I ratio in HEC-1-B cancer cells of each group

Li 等^[17]研究发现 miR-30b 可通过抑制自噬减轻肝缺血再灌注损伤。miR-30b 还通过抑制耐顺铂胃癌细胞的自噬来消除肺腺癌转移相关转录本 1 诱导的顺铂耐药性^[18]。本研究发现,抑制 miR-30b 可显著降低 HEC-1-B 癌细胞中 miR-30b 表达水平、细胞增殖率、以及 p62 蛋白表达水平,显著提高细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值,提示抑制 miR-30b 可能通过促进 HEC-1-B 癌细胞自噬,进一步促进其凋亡。而 Bai 等^[19]研究发现 AE 不但可通过抑制 miR-1 来缓解高脂饮食诱导的大鼠心电图 Q 波和 T 波时间延长,还可通过上调 miR-15a,从而抑制凋亡相关基因 Bcl-2 表达,诱导乳腺肿瘤细胞凋亡^[20]。本研究为进一步探究 AE 调控 miR-30b 对 HEC-1-B 癌细胞的影响,将 HEC-1-B 癌细胞转染 miR-30b mimics 后,使用 AE 处理,发现与 AE+miR-30b mimics NC 组相比,AE+miR-30b mimics 组癌细胞 miR-30b 表达水平、细胞增殖率以及 p62 蛋白表达水平显著升高,而细胞凋亡率、自噬率以及 Beclin1 蛋白表达水平和 LC3-II/I 比值显著降低,提示上调 miR-30b 可逆转 AE 对癌细胞发挥的作用。

综上所述,AE 可能通过抑制 miR-30b 表达,促进 HEC-1-B 癌细胞自噬,进一步抑制癌细胞增殖,促进其凋亡,而上调 miR-30b 可逆转 AE 对 HEC-1-B 癌细胞的作用。然而 AE 对子宫内膜癌的作用机制较为复杂,尚需深入研究。

参考文献:

- [1] 王艺霖,张溪.化疗在子宫内膜癌中的应用进展[J].现代妇产科进展,2018,27(4):314-317.
- [2] Dong X, Zeng Y, Liu Y, et al. Aloe-emodin: A review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics [J]. *Phytother Res*, 2020, 34(2): 270-281.
- [3] Shen F, Ge C, Yuan P. Aloe-emodin induces autophagy and apoptotic cell death in non-small cell lung cancer cells via Akt/mTOR and MAPK signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 886: 173550.
- [4] Du Y, Zhang J, Tao Z, et al. Aloe emodin exerts potent anticancer effects in MIA PaCa-2 and PANC-1 human pancreatic adenocarcinoma cell lines through activation of both apoptotic and autophagic pathways, sub-G1 cell cycle arrest and disruption of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) [J]. *J Buon*, 2019, 24(2): 746-753.
- [5] Yu Y, Liu H, Yang D, et al. Aloe-emodin attenuates myocardial infarction and apoptosis via up-regulating miR-133 expression [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 146: 104315.
- [6] 马小军,刘尚禹,张祎年,等. miRNAs 在儿童中枢神经系统常见恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2019, 46(2): 234-237.
- [7] Wang J, Sun YT, Xu TH, et al. MicroRNA-30b regulates high phosphorus level-induced autophagy in vascular smooth muscle cells by targeting BECN1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(2): 530-536.
- [8] 蒲倩.自噬相关基因 Beclin1 在乳腺癌发生发展及治疗中的作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(1): 98-103.
- [9] 潘思影,田莉,李伟宏.芦荟大黄素对人子宫内膜癌细胞 HEC-1-B 迁移及侵袭的影响 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(24): 108-110.
- [10] 包晓霞,唐瑶,鲁周南,等.清热解方连花汤提取物诱导子宫内膜癌 HEC-1A 及 Ishikawa 细胞自噬的作用及其机制研究 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2018, 19(2): 150-154.
- [11] Sanders B, Ray AM, Goldberg S, et al. Anti-cancer effects of aloe-emodin: a systematic review [J]. *J Clin Transl Res*, 2017, 3(3): 283-296.
- [12] 曾英,李灵洁,程大梅,等.芦荟大黄素对宫颈癌 HeLa 细胞放射敏感性的影响及其机制研究 [J]. *肿瘤药学*, 2018, 8(5): 690-694.
- [13] 刘豪杰,陈文礼,陈雪蕾.芦荟大黄素对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡,自噬及 p53/AMPK/mTOR 信号通路的影响 [J]. *中国药师*, 2019, 22(10): 1829-1834.
- [14] Gao R, Wu X, Huang Z, et al. Anti-tumor effect of aloe-emodin on cervical cancer cells was associated with human papillomavirus E6/E7 and glucose metabolism [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 3713-3721.
- [15] 康晶,银铎.二甲双胍治疗子宫内膜癌作用机制的研究进展 [J]. *山东医药*, 2019, 59(1): 98-101.
- [16] 展凡,王玉涵,王萌,等.新藤黄酸抑制人肝癌细胞 BEL-7402 自噬作用研究 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2020, 39(3): 46-50.
- [17] Li SP, He JD, Wang Z, et al. miR-30b inhibits autophagy to alleviate hepatic ischemia-reperfusion injury via decreasing the Atg12-Atg5 conjugate [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(18): 4501-4514.
- [18] Xi Z, Si J, Nan J. LncRNA MALAT1 potentiates autophagy-associated cisplatin resistance by regulating the microRNA30b/autophagy-related gene 5 axis in gastric cancer [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(1): 239-248.
- [19] Bai Y, Su Z, Sun H, et al. Aloe-emodin relieves high-fat diet induced QT prolongation via miR-1 inhibition and IK1 up-regulation in rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(5): 1961-1973.
- [20] Jiang X, Liu Y, Zhang G, et al. Aloe-emodin induces breast tumor cell apoptosis through upregulation of miR-15a/miR-16-1 that suppresses BCL2 [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 5108298.

[收稿日期] 2020-11-23