

紫草素对子宫内膜癌细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响

刘亚楠¹, 王炳先¹, 路臣桂¹, 杨 君^{2*}

(1. 新乡医学院三全学院临床学院, 河南 新乡 453000; 2. 新乡医学院第一附属医院妇科二病区, 河南 新乡 453000)

摘要:目的 探讨紫草素调控 *HNF1A-AS1/miR-20b-5p* 轴对子宫内膜癌细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响。方法 将子宫内膜癌细胞 HEC-1B 分为对照组、紫草素低、中、高剂量组、si-NC 组、si-HNF1A-AS1 组、miR-NC 组、miR-20b-5p 组、pcDNA-NC+ 紫草素组、pcDNA-HNF1A-AS1+ 紫草素组、pcDNA-HNF1A-AS1+ miR-NC+ 紫草素组、pcDNA-HNF1A-AS1+ miR-20b-5p+紫草素组。CCK-8 检测细胞存活率和顺铂对 HEC-1B 细胞的半抑制浓度值 (IC₅₀)；流式细胞术检测凋亡；RT-PCR 检测 *HNF1A-AS1* 和 *miR-20b-5p* 的表达；Western blot 检测 CyclinD1、Cleaved-caspase-3、MRP1 表达。双荧光素酶报告基因实验和 RT-PCR 验证 *HNF1A-AS1* 对 *miR-20b-5p* 的靶向调控作用。**结果** 低、中、高剂量紫草素处理后 HEC-1B 细胞存活率降低, 细胞凋亡率升高 ($P<0.05$, $P<0.05$), *HNF1A-AS1*、CyclinD1、MRP1 表达降低, *miR-20b-5p* 和 Cleaved-caspase-3 表达升高, IC₅₀ 值降低 ($P<0.01$)。干扰 *HNF1A-AS1* 表达或过表达 *miR-20b-5p* 后, HEC-1B 细胞存活率降低, 细胞凋亡率升高, CyclinD1、MRP1 蛋白表达降低, Cleaved-caspase-3 表达升高, IC₅₀ 值降低 ($P<0.01$)。*HNF1A-AS1* 靶向负调控 *miR-20b-5p* 表达。过表达 *HNF1A-AS1* 可以逆转紫草素对子宫内膜癌细胞 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响 ($P<0.01$)。过表达 *miR-20b-5p* 可以逆转 pcDNA-HNF1A-AS1 对紫草素处理的子宫内膜癌细胞 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响 ($P<0.01$)。**结论** 紫草素可抑制子宫内膜癌细胞存活, 诱导细胞凋亡, 提高其顺铂敏感性, 其机制与调控 *HNF1A-AS1/miR-20b-5p* 轴有关。

关键词: 紫草素; 子宫内膜癌; *HNF1A-AS1*; *miR-20b-5p*; 细胞增殖; 凋亡; 顺铂耐药

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)08-2219-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.08.044

子宫内膜癌是一种常见的女性生殖系统上皮性恶性肿瘤, 常发生于围绝经期和绝经后女性, 是导致死亡的第三位常见妇科恶性肿瘤^[1]。早期患者首选手术疗法, 术后放疗是防治其复发和转移的有效辅助手段, 然而由于化疗耐药的出现, 术后复发和转移率高, 预后较差, 严重危害女性生命健康^[2]。紫草是我国传统药用植物之一, 《本草经疏》等多种中药典籍对其药用价值均有记载。紫草素是紫草 *Lithosperma erythrorhizon* Sieb. et Zucc. 根的主要活性成分, 具有抗癌、抗炎、抗菌等作用。研究显示, 紫草素可能通过调控凋亡相关基因表达具有抑制子宫内膜癌细胞增殖并诱导凋亡的作用^[3-4], 但其作用机制以及对子宫内膜癌细胞顺铂耐药性的影响尚不清楚。肝细胞核因子 1 α 反义链 1 (*HNF1A-AS1*) 是近年来发现的致癌因子, *HNF1A-AS1* 在骨肉瘤、非小细胞肺癌等恶性肿瘤中高表达并促进肿瘤细胞的增殖和迁移^[5-6]。此外, *HNF1A-AS1* 高表达还可增强宫颈癌细胞的顺铂耐药^[7]。生物信息学分析显示, *miR-20b-5p* 是 *HNF1A-AS1* 的潜在靶基因, *miR-20b-5p* 在子宫内膜癌中低表达, 过表达 *miR-20b-5p* 可抑制肿瘤生长, 诱导肿瘤细胞凋亡^[8]。本研究旨在阐明紫草素在子宫内膜癌细

胞增殖、凋亡、顺铂耐药中的作用, 探讨其机制是否与调控 *HNF1A-AS1* 和 *miR-20b-5p* 表达有关, 以期对紫草素开发成抗肿瘤药物提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞 人子宫内膜癌细胞 HEC-1B 购于杭州亦博生物科技有限公司。

1.2 药物与试剂 杜尔伯格伊戈尔培养基 (DMEM)、胎牛血清 (SH30070)、青链霉素双抗溶液 (P1400) 购于北京索莱宝生物科技有限公司; 紫草素 (纯度 $\geq 98\%$, 批号 110769-200506) 购于上海源叶生物科技有限公司; 细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) (C0038)、膜联蛋白 V 异硫氰酸荧光素/碘化丙啶 (Annexin V-FITC/PI) 双染法细胞凋亡检测试剂盒 (C1062S) 购于上海碧云天生物科技有限公司; SYBR Green qPCR Mix (11202ES) 和逆转录试剂盒 (K1622) 购于上海翊圣生物科技有限公司; 兔源细胞周期素 D1 (CyclinD1) (#2922)、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Cleaved-caspase-3) (#9654)、 β -actin 抗体以及山羊抗兔二抗购于美国 CST 公司; 鼠源多药耐药相关蛋白 1 (MRP1) 抗体 (sc-18835)、羊抗鼠二抗 (sc-2005) 购自

收稿日期: 2020-08-16

基金项目: 新乡科技攻关计划项目 (CXGG16018); 新乡医学院三全学院骨干教师培养计划 (2020)

作者简介: 刘亚楠 (1984—), 女, 硕士, 讲师, 主治医师, 研究方向为妇科肿瘤。Tel: 13525012683, E-mail: liuyan371@163.com

* 通信作者: 杨 君 (1976—), 女, 硕士, 教授, 主任医师, 研究方向为妇科肿瘤和妇科内分泌。Tel: 13937335562, (0373) 4404220, E-mail: ysl898966@163.com

购于美国 Santa Cruz 公司; HNF1A-AS1 小干扰 RNA (si-HNF1A-AS1) 及其对照 (si-NC)、*miR-20b-5p* 模拟物 (*miR-20b-5p mimics*) 及其对照 (*miR-NC*)、*HNF1A-AS1* 过表达载体 (pcDNA-HNF1A-AS1) 及其对照 (pcDNA-NC)、PCR 引物由广州复能基因有限公司提供。

2 方法

2.1 细胞培养 HEC-1B 细胞采用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素双抗的 DMEM 培养液于 37 ℃、含 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。每隔 1 d 换液 1 次, 当细胞融合度达到 80% 时进行传代, 胰酶消化后, 选用对数生长期细胞进行后续实验。

2.2 分组和给药 实验分为对照组及紫草素低、中、高剂量组为分别加入为 0.4、0.8、1.6 μg/mL 含紫草素培养液培养 48 h; si-NC 组、si-HNF1A-AS1 组、*miR-NC* 组、*miR-20b-5p* 组为分别将 si-NC、si-HNF1A-AS1、*miR-NC*、*miR-20b-5p mimics* 转染 HEC-1B 细胞; pcDNA-NC+紫草素组、pcDNA-HNF1A-AS1+紫草素组、pcDNA-HNF1A-AS1+*miR-NC*+紫草素组、pcDNA-HNF1A-AS1+*miR-20b-5p*+紫草素组为分别将 pcDNA-NC、pcDNA-HNF1A-AS1、pcDNA-HNF1A-AS1+*miR-NC*、pcDNA-HNF1A-AS1+*miR-20b-5p mimics* 转染 HEC-1B 细胞后进行紫草素干预处理。

2.3 CCK-8 法检测细胞活力 将 HEC-1B 细胞接种到 96 孔板, 按照上述分组进行细胞处理, 每孔添加 10 μL 的 CCK-8 试剂, 培养箱孵育 2 h, 以空白孔调零, 用酶标仪测量 450 nm 波长处各孔 OD, 计算细胞存活率。细胞存活率 = (OD_{实验} - OD_{空白}) / (OD_{对照} - OD_{空白}) × 100%。HEC-1B 细胞按照上述分组进行处理后, 调整细胞浓度为 5 × 10⁴ /mL, 向每孔加入 100 μL 细胞悬液, 培养 24 h 后, 加入不同质量浓度 (0、1.25、2.5、5、10、20、40 μg/mL) 的顺铂进行处理, 培养 24 h, 采用 CCK-8 试剂盒测定各孔 OD。用 SPSS 分析计算 IC₅₀ 值。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 HEC-1B 细胞按照上述分组处理后, 调整细胞密度为 1 × 10⁶ /mL。按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书分别加入 Annexin V-FITC 和 PI 进行染色, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.5 RT-PCR 检测 *HNF1A-AS1* 和 *miR-20b-5p* 的表达 采用 Trizol 试剂提取各组细胞的总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书获得 cDNA, 并利用 SYBR Green 试剂盒进行 PCR 扩增。反应体系为 SYBR Green Master Mix 10 μL, 正向引物 0.4 μL, 反向引物 0.4 μL, cDNA 2 μL, 补加超纯水至 20 μL。引物序列 *HNF1A-AS1* 正向 5'-TCAAGAAATGCTGGCTAT-3', 反向 5'-GCTCTGAGACTGGCTGAA-3'。*miR-20b-5p* 正向 5'-CAAAGTGCTCATAGTCAGGTAG-3', 反向为通用引物。*β-actin* 正向 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3', 反向 5'-CTCCTTAATGTACGCACGAT-3'。U6 正向 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反向 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

2.6 Western blot 检测 CyclinD1、Cleaved-caspase-3 和

MRP1 蛋白的表达 细胞按照上述分组进行处理后, 加入细胞裂解液, 完全裂解后离心获得上清液即为细胞总蛋白。二喹啉甲酸法测定蛋白浓度。将蛋白样品和等体积上样缓冲液混合, 煮沸 3 min 使其变性。取 40 μg 细胞蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并将已分离的细胞蛋白转移至硝酸纤维素膜。室温条件下将膜置于 5% 的脱脂牛奶中孵育 1 h, 将膜置于稀释的一抗溶液中孵育 2 h, 洗膜后, 将膜置于稀释的二抗溶液中孵育 1 h, 洗膜后, 进行增强化学发光显色。Image J 软件对各目的条带灰度值进行分析, 以各目的条带与内参 β-actin 灰度值比值表示目的蛋白表达水平。

2.7 双荧光素酶报告基因实验 含有 *miR-20b-5p* 结合位点的 *HNF1A-AS1* 野生型 (wt-HNF1A-AS1) 或突变型 (mut-HNF1A-AS1) 荧光素酶报告基因载体的构建由上海生工公司提供。将 *miR-NC*、*miR-20b-5p mimics* 分别与 wt-HNF1A-AS1、mut-HNF1A-AS1 共转染 HEC-1B 细胞, 转染 48 h, 使用双荧光素酶报告系统测定荧光素酶活性。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 18.0 进行条件分析, 实验均设置 3 个复孔或平行实验, 重复 3 次。所有数据均采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步组间两两比较采用 SNK-q 检验。以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 紫草素对 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响 相较于对照组, 紫草素低、中、高剂量组 HEC-1B 细胞存活率降低, 细胞凋亡率升高, 细胞 IC₅₀ 值降低 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 见表 1 和图 1。

表 1 紫草素对 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 9)

组别	细胞存活率/ %	凋亡率/ %	IC ₅₀ (顺铂)/ (μg·mL ⁻¹)
对照组	100.58 ± 10.06	6.35 ± 0.64	9.68 ± 0.95
紫草素低剂量组	89.02 ± 8.90 *	13.02 ± 1.31 **	7.02 ± 0.70 **
紫草素中剂量组	75.11 ± 7.51 **	20.76 ± 2.08 **	4.92 ± 0.50 **
紫草素高剂量组	50.36 ± 5.04 **	29.88 ± 3.01 **	2.27 ± 0.23 **

注: 与对照组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01。

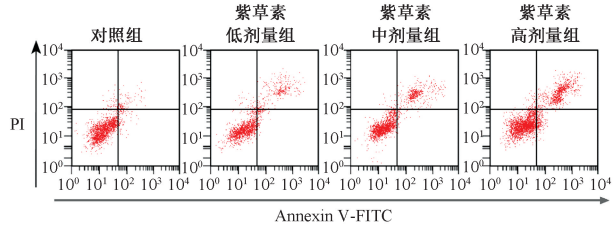


图 1 紫草素对 HEC-1B 细胞凋亡的影响

3.2 紫草素对 HEC-1B 细胞 CyclinD1、Cleaved-caspase-3、MRP1 蛋白的影响 相较于对照组, 紫草素低、中、高剂量组 HEC-1B 细胞 CyclinD1、MRP1 蛋白的表达降低, Cleaved-caspase-3 蛋白的表达增加 (*P* < 0.01), 见表 2、图 2。

表 2 紫草素对 HEC-1B 细胞中 CyclinD1、Cleaved-caspase-3、MRP1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	MRP1
对照组	1.05±0.12	0.37±0.04	1.12±0.11
紫草素低剂量组	0.82±0.08**	0.55±0.06**	0.92±0.09**
紫草素中剂量组	0.60±0.06**	0.75±0.08**	0.62±0.06**
紫草素高剂量组	0.32±0.03**	0.89±0.09**	0.30±0.03**

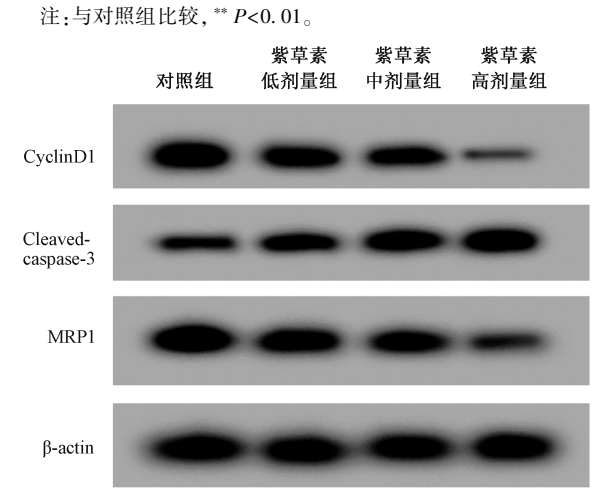
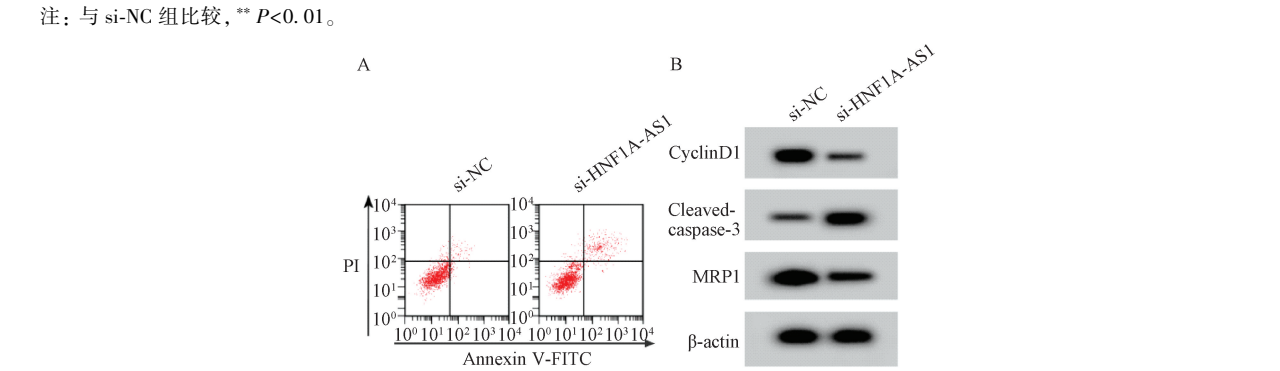


图 2 紫草素对 HEC-1B 细胞中 CyclinD1、Cleaved-caspase-3、MRP1 蛋白表达的影响

表 4 干扰 HNF1A-AS1 表达对 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	HNF1A-AS1	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	MRP1	细胞存活率/%	凋亡率/%	IC ₅₀ (顺铂)/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
si-NC 组	1.01±0.11	1.03±0.10	0.35±0.04	1.15±0.12	100.99±10.10	6.29±0.63	9.76±0.98
si-HNF1A-AS1 组	0.40±0.04**	0.37±0.04**	0.86±0.09**	0.45±0.05**	58.76±5.88**	15.88±1.59**	4.67±0.45**



注: A 为流式细胞仪检测细胞凋亡; B 为 Western blot 检测 CyclinD1、Cleaved-caspase-3、MRP1 蛋白表达。

图 3 HNF1A-AS1 低表达对 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响

表 5 miR-20b-5p 高表达对 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	miR-20b-5p	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	MRP1	细胞存活率/%	凋亡率/%	IC ₅₀ (顺铂)/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
miR-NC 组	1.02±0.11	1.06±0.11	0.38±0.04	1.17±0.12	100.27±10.05	6.32±0.64	9.66±0.97
miR-20b-5p 组	2.76±0.28**	0.42±0.04**	0.93±0.09**	0.50±0.05**	49.16±5.01**	20.24±2.03**	4.21±0.42**

注:与 miR-NC 组比较,** $P<0.01$ 。

3.6 HNF1A-AS1 靶向调控 miR-20b-5p 的表达 TargetScan 软件在线预测显示,HNF1A-AS1 和 miR-20b-5p 之间直接存在相互作用,见图 5。双荧光素酶报告基因实验显示,相较于 miR-NC 和 WT-HNF1A-AS1 共转染组,miR-20b-5p mimics 和 WT-HNF1A-AS1 共转染后 HEC-1B 细胞荧光素酶活性降低 ($P<0.05$);相较于 miR-NC 和 MUT-HNF1A-AS1 共转染组,miR-20b-5p mimics 和 MUT-HNF1A-AS1 共转染后 HEC-1B 细胞荧光素酶活性无明显变化,见表 6。RT-

3.3 紫草素对 HNF1A-AS1 和 miR-20b-5p 表达的影响 相较于对照组,紫草素低、中、高剂量组 HEC-1B 细胞 HNF1A-AS1 的表达降低,miR-20b-5p 的表达升高 ($P<0.01$),见表 3。

表 3 紫草素对 HNF1A-AS1 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

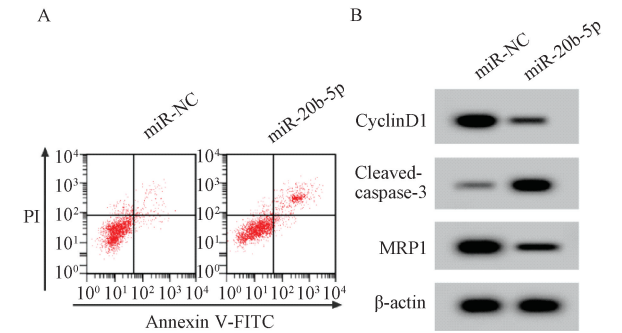
组别	HNF1A-AS1	miR-20b-5p
对照组	1.00±0.11	1.02±0.12
紫草素低剂量组	0.82±0.08**	1.64±0.17**
紫草素中剂量组	0.68±0.07**	2.32±0.24**
紫草素高剂量组	0.37±0.04**	3.31±0.33**

注:与对照组比较,** $P<0.01$ 。

3.4 干扰 HNF1A-AS1 表达对细胞 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响 相较于 si-NC 组,si-HNF1A-AS1 组 HEC-1B 细胞 HNF1A-AS1 的表达降低,CyclinD1 和 MRP1 蛋白的表达降低,Cleaved-caspase-3 蛋白的表达升高,细胞存活率降低,细胞凋亡率升高,IC₅₀降低 ($P<0.01$),见表 4、图 3。

3.5 过表达 miR-20b-5p 对 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响 相较于 miR-NC 组,miR-20b-5p 组 HEC-1B 细胞 miR-20b-5p 的表达升高,CyclinD1 和 MRP1 蛋白的表达降低,Cleaved-caspase-3 蛋白的表达升高,细胞存活率降低,细胞凋亡率显著升高,IC₅₀降低 ($P<0.01$),见表 5、图 4。

qPCR 检测显示,相较于 si-NC 组, si-HNF1A-AS1 组 HEC-1B 细胞 *miR-20b-5p* 的表达升高 ($P < 0.01$); 相较于 pcDNA-NC 组, pcDNA-HNF1A-AS1 组 HEC-1B 细胞 *miR-20b-5p* 的表达降低 ($P < 0.01$), 见表 7。提示, *HNF1A-AS1* 靶向负性调控 *miR-20b-5p* 表达。



注: A 为流式细胞仪检测细胞凋亡; B 为 Western blot 检测 CyclinD1、Cleaved-caspase-3、MRP1 蛋白表达。

图 4 *miR-20b-5p* 高表达对 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响

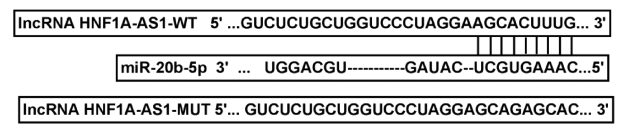


图 5 *HNF1A-AS1* 和 *miR-20b-5p* 结合示意图

表 6 miR-NC、miR-20b-5p mimics 分别与 WT-HNF1A-AS1 或 MUT-HNF1A-AS1 共转染后 HEC-1B 细胞荧光素酶活性 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	相对荧光素酶活性	
	WT	MUT
miR-NC 组	1.01±0.10	1.06±0.11
miR-20b-5p 组	0.42±0.04**	1.04±0.12

注:与 miR-NC 组比较,** $P < 0.01$ 。

3.7 过表达 *HNF1A-AS1* 可以逆转紫草素对 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响 相较于 pcDNA-NC+紫草素

组别	HNF1A-AS1	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	MRP1	细胞存活率/%	凋亡率/%	IC ₅₀ (顺铂)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
pcDNA-NC+紫草素组	1.00±0.10	0.33±0.03	0.86±0.09	0.31±0.03	52.86±5.29	30.04±3.01	2.34±0.23
pcDNA-HNF1A-AS1+紫草素组	2.42±0.24**	0.93±0.09**	0.42±0.04**	0.95±0.10**	88.63±8.86**	11.27±1.13**	7.69±0.77**

注:与 pcDNA-NC + 紫草素组比较,** $P < 0.01$ 。

组别	miR-20b-5p	CyclinD1	Cleaved-caspase-3	MRP1	细胞存活率/%	凋亡率/%	IC ₅₀ (顺铂)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
pcDNA-HNF1A-AS1+miR-NC+紫草素组	1.01±0.11	0.95±0.10	0.45±0.05	0.96±0.10	89.05±8.91	11.36±1.14	7.72±0.77
pcDNA-HNF1A-AS1+miR-20b-5p+紫草素组	2.46±0.25**	0.40±0.04**	0.75±0.08**	0.38±0.04**	63.76±6.38**	25.46±2.55**	3.99±0.40**

注:与 pcDNA-HNF1A-AS1+miR-NC+紫草素组比较,** $P < 0.01$ 。

4 讨论

紫草素是天然存在的萘醌类衍生物,其通过抑制多种

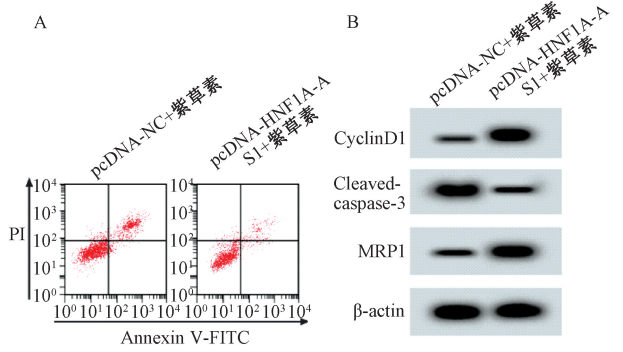
癌细胞的生长、诱导细胞凋亡而具有抗癌活性^[9]。Shilnikova 等^[10]研究显示紫草素可诱导线粒体介导的细胞

表 7 干扰或过表达 *HNF1A-AS1* 对 HEC-1B 细胞 *miR-20b-5p* 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	miR-20b-5p
si-NC 组	1.00±0.11
si-HNF1A-AS1 组	3.02±0.30**
pcDNA-NC 组	1.03±0.10
pcDNA-HNF1A-AS1 组	0.48±0.05**

注:与 si-NC 组比较,** $P < 0.01$;与 pcDNA-NC 组比较,** $P < 0.01$ 。

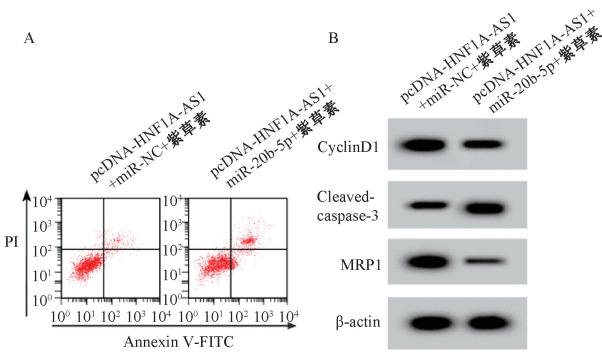
组, pcDNA-HNF1A-AS1+紫草素组 HEC-1B 细胞 *HNF1A-AS1* 的表达升高, CyclinD1 和 MRP1 蛋白的表达升高, Cleaved-caspase-3 蛋白的表达降低, 细胞存活率升高, 细胞凋亡率降低, IC₅₀ 升高 ($P < 0.01$), 见表 8、图 6。



注: A 为流式细胞仪检测细胞凋亡; B 为 Western blot 检测 CyclinD1、Cleaved-caspase-3、MRP1 蛋白表达。

图 6 过表达 *HNF1A-AS1* 可以逆转紫草素对 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响

3.8 过表达 *miR-20b-5p* 和 *HNF1A-AS1* 对紫草素处理的 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响 相较于 pcDNA-HNF1A-AS1 + miR-NC + 紫草素组, pcDNA-HNF1A-AS1+miR-20b-5p+紫草素组 HEC-1B 细胞 *miR-20b-5p* 的表达升高, CyclinD1 和 MRP1 蛋白的表达降低, Cleaved-caspase-3 蛋白的表达升高, 细胞存活率降低, 细胞凋亡率升高, IC₅₀ 降低 ($P < 0.01$), 见表 9、图 7。



注：A 为流式细胞仪检测细胞凋亡；B 为 Western blot 检测 CyclinD1、Cleaved-caspase-3、MRP1 蛋白表达。

图 7 过表达 *miR-20b-5p* 和 *HNF1A-AS1* 对紫草素处理的 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响

凋亡，减弱顺铂耐药卵巢癌细胞的上皮间质转化。Chen 等^[11]研究发现紫草素可抑制胰腺癌细胞的生长，增强吉西他滨的抗肿瘤作用。本研究发现，紫草素以剂量依赖的方式下调促增殖蛋白 CyclinD1 表达，上调促凋亡蛋白 Cleaved-caspase-3 表达，抑制 HEC-1B 细胞增殖，诱导细胞凋亡，与 Huang 等^[12]紫草素的抗子宫内腺癌作用相吻合。MRP1 是肿瘤细胞耐药的关键蛋白，其通过将大量药物转运到细胞外，对肿瘤细胞具有保护作用^[13]。本研究发现紫草素以剂量依赖的方式下调 MRP1 蛋白表达，并提高 HEC-1B 细胞对顺铂的敏感性。以上研究说明紫草素具有抗子宫内腺癌作用，并可提高其对顺铂的敏感性。

HNF1A-AS1 已被证实参与膀胱癌、胃癌等多种肿瘤进展，是肿瘤早期诊断的生物标记物^[14-15]。研究报道^[16]敲除 *HNF1A-AS1* 显著抑制结肠癌细胞增殖、迁移、侵袭和集落形成，抑制细胞周期进入 S 期，进而抑制结肠癌致瘤表型。本研究发现紫草素干预后 HEC-1B 细胞 *HNF1A-AS1* 表达显著降低。干扰 *HNF1A-AS1* 表达可抑制 HEC-1B 细胞存活，促进细胞凋亡，并提高 HEC-1B 细胞对顺铂的敏感性，与紫草素的抗子宫内腺癌作用相同。进一步恢复实验显示，过表达 *HNF1A-AS1* 可逆转紫草素对 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响。以上研究提示下调 *HNF1A-AS1* 是紫草素发挥抗子宫内腺癌作用的分子机制。

miR-20b-5p 是 *miR-17* 家族的成员之一。B 细胞淋巴瘤和 T 细胞白血病中 *miR-20b-5p* 表达失调，外周血单核细胞中 *miR-20b-5p* 表达升高是慢性淋巴细胞白血病预后良好的分子标志物^[17]。*miR-20b-5p* 上调还可抑制肾癌细胞迁移和增殖，促进细胞凋亡^[18]。此外，上调 *miR-20b* 表达还可降低 5-氟尿嘧啶耐药结肠癌细胞的耐药性^[19]。本研究发现紫草素干预后 HEC-1B 细胞 *miR-20b-5p* 表达显著增加，过表达 *miR-20b-5p* 可抑制 HEC-1B 细胞存活，促进细胞凋亡，提高 HEC-1B 细胞对顺铂的敏感性，与紫草素、干扰 *HNF1A-AS1* 表达的抗子宫内腺癌作用相同。此外，过表达 *miR-20b-5p* 还可逆转 pcDNA-HNF1A-AS1 对紫草素处理的子 HEC-1B 细胞增殖、凋亡和顺铂耐药性的影响。由于双荧

光素酶报告基因实验和 RT-PCR 证实 *HNF1A-AS1* 靶向并负调控 *miR-20b-5p* 表达，本研究推测紫草素通过调控 *HNF1A-AS1/miR-20b-5p* 轴进而影响子宫内腺癌细胞的增殖、凋亡以及顺铂耐药。

综上所述，本研究证实紫草素可抑制子宫内腺癌细胞增殖，诱导细胞凋亡，并提高其顺铂敏感性，其机制与调控 *HNF1A-AS1/miR-20b-5p* 轴有关，以期为紫草素开发成抗子宫内腺癌药物奠定理论基础。

参考文献：

[1] Sorbe B. Prognostic importance of DNA ploidy in non-endometrioid, high-risk endometrial carcinomas [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(3) : 2283-2289.

[2] Abu Saadeh F, Langhe R, Galvin D M, et al. Procoagulant activity in gynaecological cancer patients; the effect of surgery and chemotherapy[J]. *Thromb Res*, 2016, 139(1) : 135-141.

[3] 谢 伟, 薛晓鸥. 紫草素对离体子宫内腺癌细胞株增殖及凋亡信号通路 PI3K/PKB 的影响 [J]. *中医学报*, 2017, 32 (12) : 2280-2283.

[4] 尹 雯. 紫草素对子宫内腺癌 Ishikawa 细胞增殖和凋亡的影响及其机制研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25 (32) : 3548-3551.

[5] Zhao H X, Hou W G, Tao J G, et al. Upregulation of lncRNA HNF1A-AS1 promotes cell proliferation and metastasis in osteosarcoma through activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(8) : 3503-3512.

[6] Feng Z H, Wang B L. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 promotes cell viability and migration in human bladder cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4) : 4535-4540.

[7] Luo X Q, Wei J X, Yang F L, et al. Exosomal lncRNA HNF1A-AS1 affects cisplatin resistance in cervical cancer cells through regulating microRNA-34b/TUFT1 axis [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19(2) : 323-333.

[8] Zhu H, Jin Y M, Lyu X M, et al. Long noncoding RNA H19 regulates HIF-1 α /AXL signaling through inhibiting miR-20b-5p in endometrial cancer [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18 (19) : 2454-2464.

[9] Boulos J C, Rahama M, Hegazy M F, et al. Shikonin derivatives for cancer prevention and therapy [J]. *Cancer Lett*, 2019, 459 : 248-267.

[10] Shilnikova K, Piao M J, Kang K A, et al. Shikonin induces mitochondria-mediated apoptosis and attenuates epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4) : 5417-5424.

[11] Chen C Y, Xiao W Q, Huang L, et al. Shikonin induces apoptosis and necroptosis in pancreatic cancer via regulating the expression of RIP1/RIP3 and synergizes the activity of gemcitabine [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(12) : 5507-5517.

[12] Huang C M, Hu G H. Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in endometrioid endometrial cancer cells via

modulating miR-106b/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(2): BSR20171546.

[13] Lu J F, Pokharel D, Behawy M. MRP1 and its role in anticancer drug resistance [J]. *Drug Metab Rev*, 2015, 47(4): 406-419.

[14] Liu H T, Liu S, Liu L, *et al.* EGR1-mediated transcription of lncRNA-HNF1A-AS1 promotes cell-cycle progression in gastric cancer[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(20): 5877-5890.

[15] Feng Z H, Wang B L. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 promotes cell viability and migration in human bladder cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 4535-4540.

[16] Zhu W Y, Zhuang P P, Song W, *et al.* Knockdown of lncRNA HNF1A-AS1 inhibits oncogenic phenotypes in colorectal carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 4694-4700.

[17] Papageorgiou S G, Kontos C K, Tsiakanikas P, *et al.* Elevated miR-20b-5p expression in peripheral blood mononuclear cells; a novel, independent molecular biomarker of favorable prognosis in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Leuk Res*, 2018, 70(1): 1-7.

[18] Li Y F, Chen D Q, Jin L, *et al.* MicroRNA-20b-5p functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma by regulating cellular proliferation, migration and apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1895-1901.

[19] 余灵芝, 戴丹平, 项秀瑶. miR-20b 通过抑制 JAK/STAT3 信号通路逆转结肠癌细胞 5-FU 耐药性的研究[J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27(9): 544-550.

中药防治新型冠状病毒肺炎（COVID-19）恢复期肺纤维化的作用

朱元章^{1,2}, 何志高², 张 明^{2*}

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院药剂科, 上海 200025; 2. 上海中医药大学附属龙华医院药学部, 上海 200032)

摘要: 新型冠状病毒肺炎（COVID-19）会造成严重的肺损伤, 处于恢复期的患者肺部病灶吸收后会留有不同程度的纤维化改变。这类 COVID-19 恢复期伴纤维化的患者以正虚邪恋为主要特点, 当补气、养阴以扶正, 祛痰、活血以祛邪。收集归纳了部分用于 COVID-19 恢复期的方剂并对用药频次进行统计。针对其中出现频次较高的中药, 分别从补气、养阴、祛痰、活血四方面探讨其对 COVID-19 恢复期肺纤维化的作用, 以期 COVID-19 恢复期伴纤维化的治疗提供新的思路和理论依据。

关键词: 新型冠状病毒肺炎; 恢复期; 肺纤维化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)08-2224-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.08.045

自 2019 年 12 月以来, 新型冠状病毒肺炎（Corona Virus Disease 2019, COVID-19）在武汉被发现并以惊人的速度席卷全球。截止至 2021 年 2 月 2 日, 全球累计确诊 1 亿人, 累计治愈 7 389 万人, 死亡 224 万人, 疫情十分严峻。目前我国已累计确诊 101 039 例, 累计治愈 93 726 例, 死亡例 4 826 例, 还在治疗期间 2 487 例, 其中重症 72 例。

实验室研究表明, COVID-19 与 SARS-CoV（非典）同属于冠状病毒^[1], 具有 79.5% 的基因序列相似度, 根据 SARS 患者的预后经验及目前的相关报道^[2-4], 推测肺纤维化可能是 COVID-19 后遗症中发生概率较高的一种。已知的临床观察也证明, 恢复期患者可见肺部病灶吸收后会留有不同程度的肺间质纤维化^[5]。对于肺纤维化的治疗, 目前西医普遍采用糖皮质激素、抗酸制剂及免疫抑制剂进行治疗, 但疗效欠佳。而中医治疗肺纤维化的作用已经被大

量临床研究所证实^[6-7], 效果明确, 不良反应小, 在疗效、转归及预后上都有着一定的优势。因此及早采用中医药治疗, 对 COVID-19 恢复期伴有肺纤维化病人的肺功能的恢复和 COVID-19 的预后都具有重要的临床意义。

1 肺纤维化的中医理论基础

1.1 “肺痹”“肺痿” 有学者认为^[8], “肺痹”“肺痿”各代表了肺纤维化的不同阶段和（或）不同证候特点, 即肺纤维化患者表现出气阴两虚、虚热灼肺或肺气虚冷的证候特点则按照肺痿论治, 若表现为肺气痹阻之实证特点则按照“肺痹”论治。肺纤维化的干咳及后期出现咳吐涎沫的症状与肺痿相似, 正如《外台秘要》所云“肺气咳经久将成肺痿……唾白如雪, 细沫稠粘, 喘息气上, 乍寒乍热, 发作有时, 唇口喉舌干焦, 亦有时唾血者, 渐觉瘦悴”, 故可归为肺痿。肖小花等^[9]则根据肺纤维化与肺痿在症状、

收稿日期: 2021-01-08

作者简介: 朱元章 (1989—), 男, 博士, 主管中药师, 从事中药抗肿瘤研究。Tel: 15021112960, E-mail: bakerzyz@126.com

* 通信作者: 张 明 (1984—), 女, 硕士, 主管中药师, 从事中药临床药学、药物不良反应研究。Tel: 13818363785, E-mail: zhangming1984sh@163.com