

## 甲基莲心碱通过影响微小RNA抑制鼻咽癌细胞侵袭转移的机制研究

何香兰, 李 维, 谭国林, 宋业勋\*, 马艳红\*

(中南大学湘雅三医院, 湖南 长沙 410013)

**摘要:** 本文以鼻咽癌 CNE-1 和 5-8F 细胞为研究对象, 检测甲基莲心碱 (neferine, Nef) 抑制鼻咽癌侵袭转移的作用, 探讨其抑制侵袭转移的机制。CCK-8 法检测鼻咽癌细胞活性; 划痕实验、Transwell 细胞体外迁移侵袭实验观察 Nef 对鼻咽癌 CNE-1、5-8F 细胞侵袭、迁移能力的影响; Western blot 法检测上皮-间质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白及其转录因子表达水平; miRNA 基因芯片检测 Nef 处理过的 5-8F 细胞与对照组 miRNA 差异基因表达谱, 对差异表达基因进行生物信息学分析及筛选, 同时研究其表达与鼻咽癌侵袭转移的相关性。实验结果显示:  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Nef 对鼻咽癌 CNE-1、5-8F 细胞活性无明显影响, Nef 能显著抑制鼻咽癌细胞的侵袭与转移, Western blot 结果显示 Nef 使鼻咽癌 CNE-1、5-8F 细胞中神经型钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (vimentin) 表达下调, 上皮型钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达上调, Twist、Snail、Slug 转录因子无显著表达差异; miRNA 基因芯片结果显示 Nef 作用后的 5-8F 鼻咽癌细胞与对照组相比共 10 个 miRNA 有 2 倍以上表达差异, 其中 hsa-let-7c-5p 与 hsa-miR-423-5p 表达差异最显著, 分别下调至 30.6%、28.6%。生物信息分析显示 hsa-let-7c-5p 与 hsa-miR-423-5p 有共同的下游靶基因: 小细胞膜蛋白 3 (small integral membrane protein 3, SMIM3)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)。鼻咽癌 5-8F 细胞转染 hsa-let-7c-5p mimic 与 hsa-miR-423-5p mimic 后增强其侵袭与转移能力, SMIM3、NGF 表达下调。以上研究结果表明, Nef 可能通过抑制 hsa-let-7c-5p 与 hsa-miR-423-5p 的表达, 作用于下游靶基因 SMIM3、NGF, 抑制 EMT 相关蛋白的表达, 从而抑制鼻咽癌细胞的侵袭转移。研究结果为 Nef 抑制肿瘤侵袭转移提供实验依据。

**关键词:** 甲基莲心碱; 鼻咽癌; 侵袭转移; 作用机制

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)08-1417-07

## Mechanisms of inhibition of invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by neferine through its influence on microRNAs

HE Xiang-lan, LI Wei, TAN Guo-lin, SONG Ye-xun\*, MA Yan-hong\*

(The Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China)

**Abstract:** This study was designed to investigate the inhibitory effect and mechanism of neferine (Nef) on invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells (NPC). The viability of CNE-1 and 5-8F cells was detected by CCK-8 assay after treatment with different concentrations of Nef. The effects of Nef on cell migration and invasion were detected by the scratch test and Transwell assay. Western blot analysis was used to detect the effects of Nef on levels of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-associated proteins and transcription factors. The differentially expressed gene profiles between control group and Nef group were analyzed by microRNA microarray, combined with bioinformation analysis. It was observed that  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Nef had no significant effect on the viability of CNE-1 and 5-8F cells. Western blot assay showed that the expression level of neurotrophin cadherin (N-cadherin) and vimentin decreased after treatment with Nef, while the expression of epithelial cadherin

收稿日期: 2018-12-10; 修回日期: 2019-01-02.

基金项目: 中南大学湘雅三医院“新湘雅人才工程”资助项目 (JY201617); 湖南省自然科学基金资助项目 (13JJ3035).

\*通讯作者 Tel: 18711099612, E-mail: yexunsongent@163.com;

Tel: 13875938721, E-mail: 1549557475@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-1100

(E-cadherin) increased. The expression of transcription factors including Twist, Snail, and Slug exhibited no significant difference. Results of the microRNA microarray suggest that 10 microRNAs showed significant differences when compared with the control group. Bioinformatics analysis showed that hsa-let-7c-5p and hsa-miR-423-5p targeted the same downstream genes: small integral membrane protein 3 (SMIM3) and nerve growth factor (NGF). Overexpression of hsa-let-7c-5p and hsa-miR-423-5p promoted the invasion and migration ability of 5-8F cells and decreased the expression of SMIM3 and NGF. The results from this study suggest that Nef may inhibit the invasion and metastasis of NPC cells by inhibiting the expression of hsa-let-7c-5p and hsa-miR-423-5p followed by the upregulation of SMIM3 and NGF; thus, regulating the expression of EMT-associated proteins. Our data have provided experimental evidence for the inhibition of tumor invasion and metastasis by Nef.

**Key words:** neferine; nasopharyngeal cancer; metastasis and invasion; mechanism

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是一种主要发生在我国南方地区的鼻咽部恶性肿瘤, 由于鼻咽癌发生的部位比较隐蔽, 早期症状常不明显而容易被忽略, 因此确诊的患者 60% 以上都处于癌细胞转移的中、晚期, 而侵袭和转移是导致鼻咽癌患者死亡的主要原因之一<sup>[1,2]</sup>, 因此研究肿瘤细胞的侵袭转移机制, 指导临床用药, 是本课题组研究的主要方向。

甲基莲心碱 (neferine, Nef) 是从睡莲科植物莲成熟种子的绿色胚芽中提取出的一种双苄基异喹啉类生物碱。它具有扩血管、降压、抗心律失常、抗血小板聚集等药理作用<sup>[3-5]</sup>。近些年来研究表明, Nef 对骨肉瘤、乳腺癌和肺癌等<sup>[6-10]</sup>具有化疗药物增敏作用, 在肝癌细胞中具有抑制肝癌细胞侵袭转移的作用<sup>[11]</sup>, 而 Nef 在鼻咽癌的侵袭转移方面暂无研究进展。本文以人鼻咽癌细胞株 CNE-1 和 5-8F 为研究对象, 通过观察 Nef 对 CNE-1 和 5-8F 细胞侵袭、转移的影响, 探讨 Nef 对鼻咽癌细胞侵袭转移的作用及机制, 为 Nef 在鼻咽癌侵袭、转移的临床应用提供实验基础。

## 材料与方法

**实验材料** RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司); 新生小牛血清 (美国 Hyclone 公司); 胰蛋白酶 (美国 Sigma 公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 德国 BioFroxx 公司); CCK-8 试剂盒 (中国联科生物技术有限公司); HiPerFect Transfection Reagent (美国 Qiagen 公司); Nef (纯度 99.16%, 中国成都植标化纯生物技术有限公司); Transwell 小室 (美国 Corning 公司); Mastercycler Ep Realplex 实时荧光定量 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。Total RNA Kit I (中国 Omega 公司); 微小 RNA (microRNA, miRNA) mimic、Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Starter Kit、RT-PCR primer (中国 Ribobio 公司); 引物 (中国上海生工生物公司)。GAPDH、神经型钙黏蛋白 (N-cadherin)、上皮型钙黏蛋白 (E-cadherin)、波形蛋白 (vimentin)、Twist、Slug 和 Snail 兔抗人单克隆抗体 (英国 Abcam 公

司); 荧光二抗 (美国 GE 公司); 蛋白质提取试剂盒 (中国江苏凯基生物技术股份有限公司)。

**细胞培养及配置 Nef 溶液** 人鼻咽癌细胞系 CNE-1、5-8F 由中南大学肿瘤研究所赠送。采用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基, 至 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。用 20 μmol·L<sup>-1</sup>、30 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度 Nef 连续刺激 CNE-1、5-8F 细胞。20 mg Nef 充分溶解于 1 mL DMSO 溶剂中, 配成 32 mmol·L<sup>-1</sup> 母液, -4 °C 贮存备用。

**CCK-8 检测细胞增殖** 取对数生长期的鼻咽癌细胞 CNE-1、5-8F, 胰酶消化后制成细胞悬液, 细胞悬液移至 96 孔板, 每孔 100 μL, 调整细胞密度为每孔 5×10<sup>3</sup> 个, 预培养 12 h 待细胞贴壁。Nef 母液用无胎牛血清的 RPMI-1640 培养基依次稀释成 10、20、30、40 μmol·L<sup>-1</sup>, 4 组实验组培养板分别加入 10 μL 不同浓度的 Nef; 阴性对照组加入等体积的 DMSO, 各浓度实验组和对照组均设 5 个复孔, 培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 反应液, 孵育 1 h, 酶标仪测定各组在 450 nm 处吸光度值 (A)。细胞存活率 (%) =  $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。计算 CNE-1、5-8F 细胞 Nef 最适用药浓度继续如下实验。

**划痕实验** 将 CNE-1、5-8F 细胞以每孔 5×10<sup>5</sup> 个细胞接种于 6 孔板中, 培养 12 h 待细胞单层铺满后, 分别加入 DMSO、20 μmol·L<sup>-1</sup> Nef、30 μmol·L<sup>-1</sup> Nef, 更换无血清培养基培养, 待细胞贴壁后, 以 200 μL 枪头垂直方向划痕, PBS 清洗脱落细胞 3 次, 观察无血清培养基培养 0、24、36 h 时细胞迁移距离, 迁移比率 = (0 h 的边缘距离 - N h 的边缘距离) / 0 h 的边缘距离。实验重复 3 次, 取平均值为最终结果。

**Transwell 细胞体外侵袭、迁移实验** 冰上将融化后的 BD Matrigel 用冰的 1640 培养基稀释 10 倍, 混匀, 往预冷的 Transwell 板上室加稀释后的 Matrigel, 每孔 50 μL, 均匀铺平, 并置于细胞培养箱中孵育 3~4 h。消化已用无血清培养基 RPMI-1640 饥饿培养的 CNE-1、5-8F 细胞, 细胞计数, 调整细胞浓度为每孔 5×10<sup>4</sup> 个,

离心, 弃上清液后, 实验组分别加入  $100 \mu\text{L}$   $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Nef 重悬细胞, 对照组  $100 \mu\text{L}$  含等量 DMSO 无血清的 RPMI-1640 培养基重悬细胞于 Transwell 上室中, 下室加入  $800 \mu\text{L}$  含 10% 胎牛血清培养液, 置于培养箱中孵育 48 h 后取出 Transwell 板, 移去培养液, PBS 清洗 Transwell 小室, 4% 多聚甲醛固定, 无水甲醛透化, 0.1% 结晶紫染色, 棉签轻轻擦拭没有侵袭的细胞及基质胶, 干燥后, 倒置显微镜下随机视野观察并拍照, 实验相同条件下重复 3 次。细胞迁移实验上室未铺 Matrigel, 其余步骤与细胞侵袭实验相同。

**Western blot 实验检测上皮-间质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白表达** 以  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Nef、DMSO 处理 24 h 后的 CNE-1、5-8F 细胞为研究对象, 分别提取细胞总蛋白, BCA 法对蛋白进行定量, 蛋白变性处理后每孔加样  $20 \mu\text{g}$ , 在 6%、12% SDS-PAGE 胶上电泳 60 min, 电泳完毕后在 300 mA 恒流下转膜 90 min。转膜完毕后, 将电转膜置于 5% 的脱脂奶粉 (PBS 配制) 中封闭,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜。封闭的膜用磷酸盐缓冲液加 Tween 20 配制的 PBST 漂洗 3 次, 加入一抗 (1:2 000) 孵育  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜。弃去一抗, PBST 洗涤 10 min, 反复 3 次。加入荧光二抗 (1:5 000) 室温避光下于摇床孵育 1 h, 弃去二抗, PBST 洗涤 10 min, 反复 3 次, 荧光发光显色。

**基因芯片实验及生物信息学分析** 以分别用 DMSO、 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Nef 处理的 5-8F 为实验对象, 分别提取细胞 miRNA, 使用 Affymetrix 的表达谱芯片 HG U133Plus 2.0 array 进行基因芯片杂交实验。运用 miRNA 靶向预测软件对芯片结果进行生物信息学分析。

**细胞转染及转染效率的检测** 实验分 2 组: ① hsa-let-7c-5p/hsa-miR-423-5p mimic+HiPerFect (mimic 组); ② NC+HiPerFect (NC 组)。将细胞以每孔  $2\times 10^5$  接种于 6 孔板, 培养 24 h 后换新鲜培养液, 按操作说明以等量无血清培养基分别稀释适量的 miRNA mimic/NC 和 HiPerFect, 混匀后各自室温静置 5 min, 加入培

养板中, 轻轻混匀, 放入培养板中继续培养, 转染带荧光的 miRNA mimic/NC 时, 所有操作均需避光操作, 并以锡箔纸包被培养板放置培养箱中培养, 转染 48 h 后用 PBS 冲洗 1 次, 荧光显微镜下观察转染效率。

**Real-time PCR 检测各 miRNA 与下游 mRNA 的表达** 各组 5-8F 细胞经转染 48 h 后按照 Trizol 说明书中步骤抽提细胞 miRNA, 取 RNA 于紫外分光光度计下测  $A_{260}/A_{280}$  比值处于 1.8~2.2 之间则符合纯度要求。按 Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR 试剂盒说明配制逆转录反应液, 逆转录合成 cDNA 后, 参照试剂盒说明配制 PCR 反应体系, 每组设置 3 个复孔。PCR 反应步骤:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  10 min,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  2 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  20 s,  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  10 s, 共 40 个循环。反应以 U6 和 actin 为内参。记录各孔 Ct 值, 取 3 孔平均值作为结果, 并采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法对结果进行分析,  $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct 目标基因} - \text{Ct 内参基因})$  处理组 -  $(\text{Ct 目标基因} - \text{Ct 内参基因})$  对照组。

**统计学方法** 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 GraphPad Prism 5 软件对数据进行分析并作图, 两样本均数比较采用 *t* 检验, 多个样本均数比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为具有统计学显著性差异。

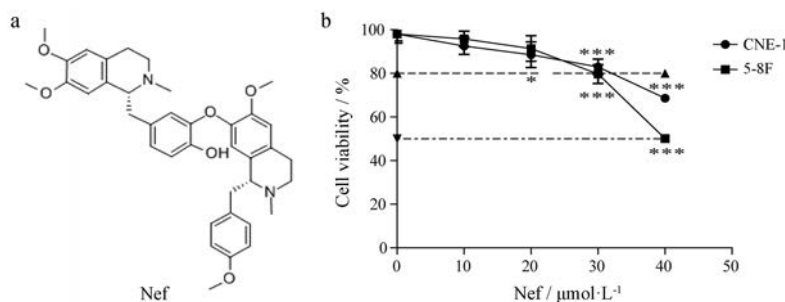
## 结果

### 1 不同浓度 Nef 对 CNE-1 和 5-8F 细胞毒性的影响

Nef 为从莲子中提取的双苄基异喹啉生物碱, Nef 的分子式  $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_6$  (结构式见图 1a, 含酚羟基)。采用 CCK8 方法, 观察不同浓度 Nef 作用 24 h 后对 CNE-1 和 5-8F 细胞活性的影响, 结果显示, Nef 浓度为  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时 CNE-1、5-8F 细胞的存活率均大于 80% (图 1b)。因此, 后续的实验选择  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Nef 处理 CNE-1 细胞、5-8F 细胞。

### 2 Nef 对 CNE-1 和 5-8F 细胞迁移及侵袭的影响

Nef 抑制 CNE-1 和 5-8F 细胞迁移及侵袭作用, 划痕实验结果显示, Nef 处理后的 CNE-1、5-8F 细胞对比



**Figure 1** Nef concentration-response (cell viability) curves. a: Chemical structure of Nef; b: Effect of Nef on cell viability of CNE-1 and 5-8F cells.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . CNE-1 and 5-8F cells were treated with different doses of Nef for 24 h and cell viability detected by CCK-8 assay. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group. Nef: Neferine

对照组细胞, 划痕间距缩小, 速率明显减慢, 且随着 Nef 浓度增大细胞迁移速率减慢越显著, 差异具有统计学意义 (图 2a、b)。Transwell 迁移、侵袭实验显示, Nef 处理的 CNE-1 和 5-8F 细胞相比对照组, 细胞侵袭、迁移能力明显减弱, Nef 浓度为  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时能显著抑制 CNE-1 和 5-8F 细胞的迁移、侵袭能力, 差异具有统计学意义 (2c、d)。

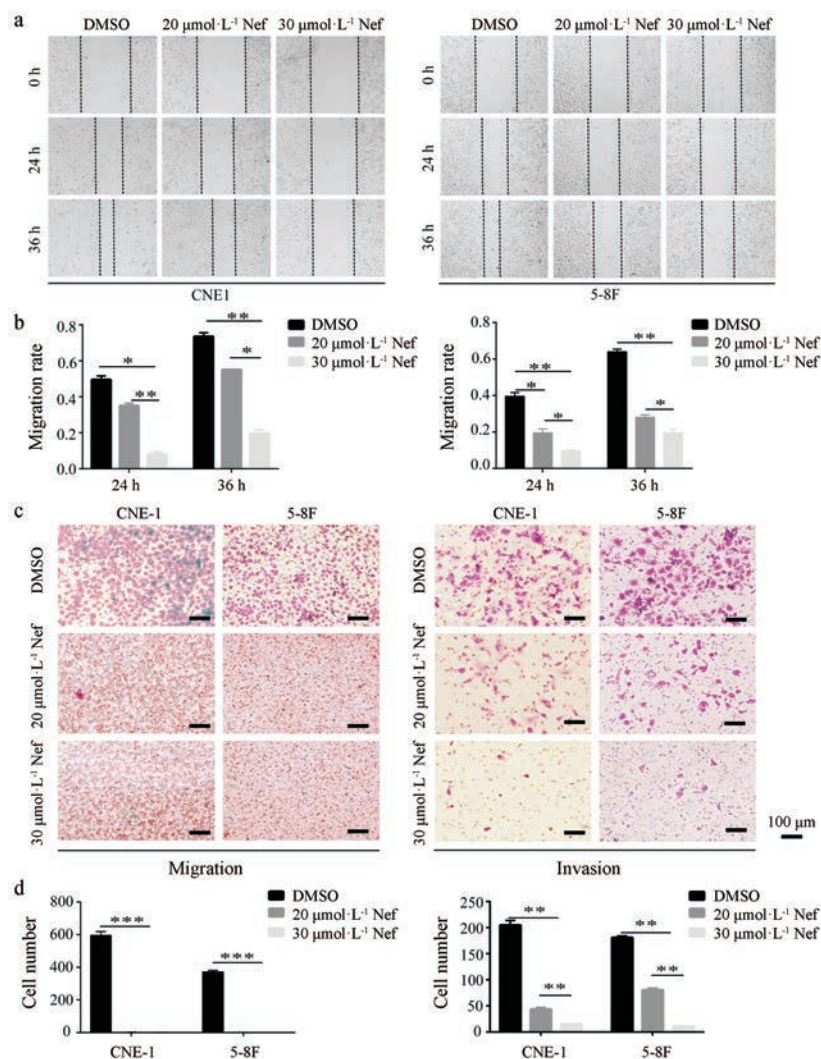
### 3 Nef 对 CNE-1 和 5-8F 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

Western blot 实验结果显示,  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Nef 处理后的 CNE-1 细胞 Twist、Snail、N-cadherin、vimentin 表达水平下调, E-cadherin 表达上调, 差异具有统计学意义, Slug 转录因子无显著差异性表达; 5-8F 细胞中 Slug、N-cadherin、Vimentin 表达水平下调, E-cadherin

表达上调, 差异具有统计学意义, Snail、Twist 转录因子无显著差异性表达 (图 3a、b)。上述实验显示: Nef 能调控 EMT 相关蛋白的表达, 而对 Snail、Twist、Slug 转录因子无显著调控作用。

### 4 基因芯片筛选、验证 Nef 作用 5-8F 细胞后 miRNA 差异表达基因

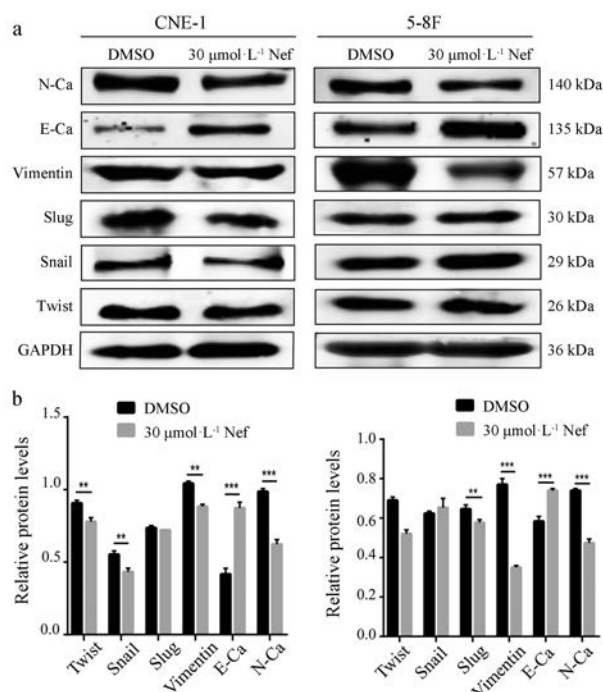
miRNA 基因芯片检测分别以 DMSO、 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Nef 处理过的 5-8F 细胞 miRNA 表达结果显示, 表达倍数改变  $>2$ , 且  $P$  值  $<0.05$  的有 10 个 miRNA (表 1), 其中表达下调的 6 个 miRNA 分别为 hsa-miR-130b-5p、hsa-miR-6505-5p、hsa-miR-2682-5p、hsa-let-7c-5p、hsa-miR-423-5p、hsa-miR-4521, 表达上调的 4 个 miRNA 分别为 hsa-miR-499a-5p、hsa-miR-122-5p、hsa-miR-584-5p、hsa-miR-novel-chr6-74248 (图 4a~c), 其中 hsa-let-7c-



**Figure 2** Effects of Nef on the migration and invasion of CNE-1 and 5-8F cells. The migration (a) and relative migration ability analysis (b) of CNE-1 and 5-8F cells with different doses of Nef were examined by scratch assay for 24 h and 36 h. Effects of Nef on migration and invasion in CNE-1 and 5-8F cells (c, d) were analyzed by Transwell assay for 48 h; quantification is expressed as the number of invasive cells in three random microscopic fields per well. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (100 $\times$ magnification)

**Table 1** Differentially expressed gene profiles between the control group and the Nef group (fold change >2)

Gene	Gene sequence	Fold change (neferine vs DMSO)	P-value
hsa-miR-130b-5p	ACUCUUUCCUGUUGCACUAC	0.412 95	0.006 98
hsa-miR-6505-5p	UUGGAAUAGGGGAUAUCUCAGC	0.387 23	0.024 11
hsa-miR-2682-5p	CAGGCAGUGACUGUUCAGACGUC	0.374 80	0.042 12
hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	0.305 88	0.030 83
hsa-miR-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	0.285 71	0.018 99
hsa-miR-4521	GCUAAGGAAGUCCUGUGCUCAG	0.446 60	0.014 34
hsa-miR-499a-5p	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU	2.418 60	0.048 26
hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUU	2.907 69	0.021 72
hsa-miR-584-5p	UUAUGGUUUGCCUGGGACUCAG	2.281 17	0.007 74
hsa-miR-novel-chr6-74248	AGGUGUAGAAUAAGUGGGAGGCC	3.030 48	0.009 87

**Figure 3** Effects of Nef on the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-associated proteins. CNE-1 and 5-8F cells were cultured with 30 μmol·L<sup>-1</sup> Nef for 24 h and EMT-associated proteins analyzed by Western blot assay (a, b). \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001. E-Ca: E-cadherin; N-Ca: N-cadherin

5p 和 hsa-miR-423-5p 表达变化最明显, 分别下调至 30.6% 和 28.6%, RT-PCR 检测 30 μmol·L<sup>-1</sup> Nef 处理后的 5-8F 细胞中 hsa-let-7c-5p、hsa-miR-423-5p 表达趋势与芯片一致, 运用 miRNA 靶向预测软件对基因芯片结果做进一步的生物信息分析, 显示在 30 μmol·L<sup>-1</sup> Nef 处理后的 5-8F 细胞中下调的 hsa-let-7c-5p、hsa-miR-423-5p 具有共同的下游靶向负调控基因: 小细胞膜蛋白 3 (small integral membrane protein 3, SMIM3)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)。Real-time PCR 验证转染 hsa-let-7c-5p mimic、hsa-miR-423-5p mimic 后 5-8F 细胞中 SMIM3、NGF 的表达: SMIM3、NGF 表达显著下降, 差异具有统计学意义 (图 4d、e)。

### 5 5-8F 细胞转染 hsa-let-7c-5p mimic、hsa-miR-423-5p mimic 后迁移及侵袭能力增强

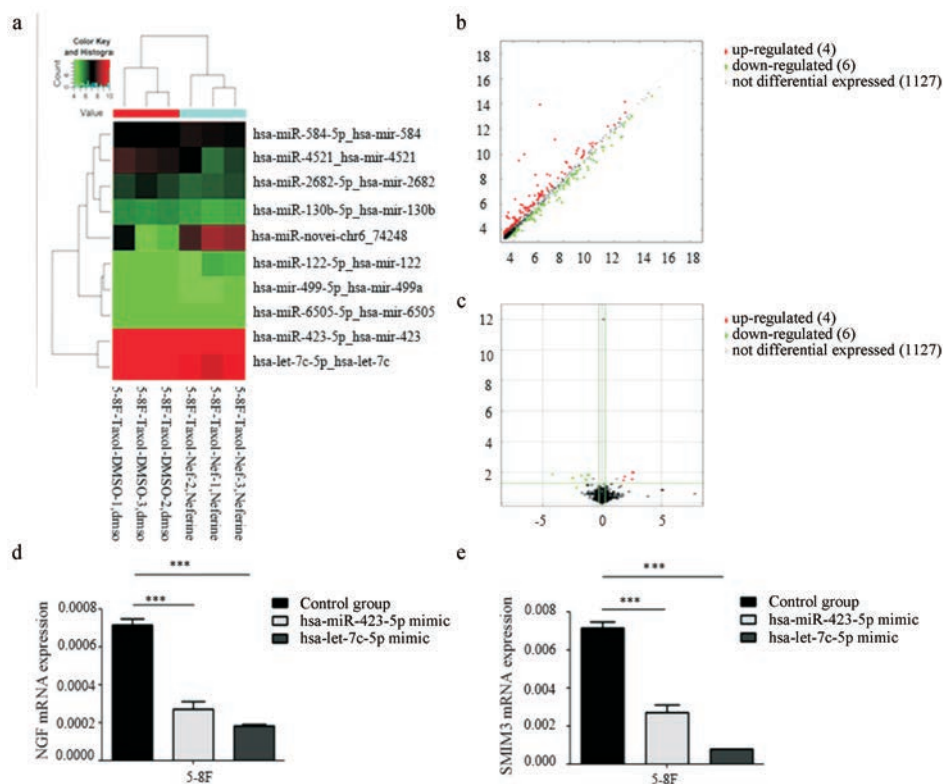
5-8F 细胞经 hsa-let-7c-5p mimic、hsa-miR-423-5p mimic 转染后, 划痕实验显示其细胞迁移能力相对对照组显著增强 (图 5a、b), Transwell 侵袭、迁移实验显示其迁移、侵袭能力增强 (图 5c、d)。hsa-let-7c-5p、hsa-miR-423-5p 能增强鼻咽癌 5-8F 细胞的迁移、侵袭能力。下调 hsa-let-7c-5p、hsa-miR-423-5p 的表达水平可能抑制鼻咽癌细胞的迁移、侵袭能力。

### 讨论

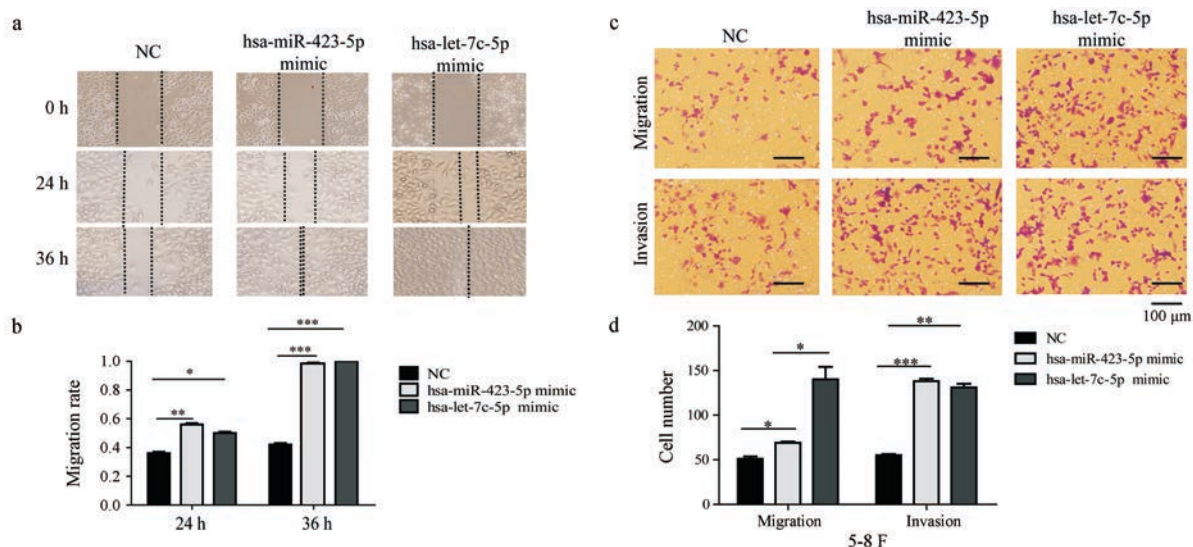
鼻咽癌是头颈部常见恶性肿瘤, 临床治疗以放射治疗为主, 化疗为辅, 鼻咽癌具有较高的侵袭性和淋巴结转移倾向, 没有发生远处转移的鼻咽癌患者的临床治疗 5 年生存率可达 80% 以上, 而发生了复发、远处转移的患者的临床治疗 5 年生存率显著下降<sup>[12,13]</sup>, 鼻咽癌侵袭、转移是患者治疗预后不佳的主要原因之一。

Nef 为睡莲科植物莲的成熟种子绿色胚芽中提取出来的一种双苄基异喹啉生物碱。周雅君等<sup>[14]</sup>的研究显示 Nef 能通过抑制肝癌细胞 Rho/ROCK 信号通路抑制肝癌细胞增殖和侵袭作用; Deng 等<sup>[15]</sup>的研究显示 Nef 通过抑制肝癌细胞 EMT 相关蛋白的表达从而抑制其侵袭转移。在本课题组实验中, 通过划痕实验、Transwell 细胞体外迁移、侵袭实验显示 Nef 可显著抑制 CNE-1 和 5-8F 细胞的迁移、侵袭能力。Western blot 实验结果显示, Nef 下调 CNE-1、5-8F 细胞中 N-cadherin、Vimentin 的表达, 上调 E-cadherin 的表达。上述实验表明 Nef 能显著抑制鼻咽癌细胞的侵袭转移能力。

miRNA 是一类短链非编码单链 RNA, 可通过结合 mRNA 非编码区 (UTRs) 抑制 mRNA 翻译, 发挥基因转录后水平的负调控作用。miRNA 可调控生物生长、发育、繁殖、癌变进程。研究显示, let-7 家族是一类功能和碱基序列高度保守的 miRNA, 调控癌细胞的增殖、分化, hsa-let-7c-5p 为 let-7 家族的一员<sup>[16]</sup>, 可在肝癌细胞中调控 Bcl-xL 基因的表达, 进而调节癌细胞的凋



**Figure 4** Analysis and verification for the results of gene chip. Cluster analysis (a) of microRNAs in 5-8F cells (green: down-regulated, red: up-regulated); 6 microRNAs down-regulated and 4 microRNAs up-regulated after the action of  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Nef. Scatter map (b) and volcanic map (c) of differential gene expression between 5-8F cells treated with  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Nef and the control group. Effect of hsa-let-7c-5p mimic or hsa-miR-423-5p mimic on NGF (d) and SMIM3 (e). mRNA level in 5-8F cells was detected by qPCR. \*\*\* $P < 0.001$ . NGF: Nerve growth factor; SMIM3: Small integral membrane protein 3



**Figure 5** Overexpression of hsa-let-7c-5p and hsa-miR-423-5p promoted the invasion and migration ability of 5-8F cells. Migration (a) and relative migration ability (b) of 5-8F cells with different doses of Nef for 24 h and 36 h. Effects of Nef on migration and invasion in 5-8F cells (c, d) analyzed by Transwell assay after 48 h of transfection. Quantification of the migration and invasion is expressed as the number of invasive and migratory cells in three random microscopic fields per well. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (100×magnification)

亡进程<sup>[17]</sup>, 可作为结肠癌的治疗靶点和预后的生物标志物<sup>[18]</sup>。hsa-miR-423-5p可在肝癌细胞中增强癌细胞

的自噬进程<sup>[19,20]</sup>, 为了进一步探究Nef抑制鼻咽癌细胞侵袭转移与miRNA的相关性, 本研究对Nef处理过的

5-8F细胞与对照组细胞的miRNA的表达进行基因芯片检测,结果显示,有10个表达倍数改变 $>2$ ,且 $P<0.05$ 的miRNA,其中,hsa-let-7c-5p、hsa-miR-423-5p表达下调倍数最显著,Real-time PCR结果与基因芯片一致,hsa-let-7c-5p mimic、hsa-miR-423-5p mimic转染至5-8F细胞后,细胞划痕实验、Transwell迁移侵袭实验显示鼻咽癌细胞侵袭转移能力增强,上述实验表明:hsa-let-7c-5p、hsa-miR-423-5p可能增强鼻咽癌细胞的侵袭、转移能力。

通过miRNA靶向预测软件分析miRNA基因芯片结果显示:hsa-let-7c-5p、hsa-miR-423-5p有共同的下游靶向负调控基因:SMIM3、NGF基因,NGF因子是神经生长蛋白家族的一种,是一种与神经细胞的分化、生长、修复、再生有关的细胞因子。研究表明,NGF在鼻咽癌中诱导癌细胞凋亡<sup>[21]</sup>。SMIM3是个未知的基因,可能分泌与细胞膜跨膜结构域的形成和调节离子通道有关蛋白,SMIM3在嗜铬细胞瘤中可由NGF诱导分泌<sup>[22]</sup>。

综上所述,本研究通过细胞实验显示Nef可能通过下调鼻咽癌细胞hsa-let-7c-5p、hsa-miR-423-5p的表达水平,改变下游靶基因SMIM3、NGF表达水平,抑制鼻咽癌EMT相关蛋白的表达,从而抑制鼻咽癌的侵袭转移。hsa-let-7c-5p、hsa-miR-423-5p对SMIM3、NGF基因的调控机制以及SMIM3、NGF基因的具体生物学功能尚不清楚,有待于进一步研究。

## References

- [1] Chen J. The Initial Investigation of the Relationship between Nasopharyngeal Carcinoma-related Gene ID2 and EMT (鼻咽癌相关基因ID2与EMT关系的初步探讨) [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2010.
- [2] Ding JH, Su FR, Bo L. Research development of nasopharyngeal carcinoma [J]. Int J Otolaryngol Head Neck Surg (国际耳鼻咽喉头颈外科杂志), 2017, 41: 43-46.
- [3] Tang XQ, Cao JG. Review on the pharmacological research of neferine [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2004, 20: 8-10.
- [4] Wang JL, Nong Y, Jiang MX. Effects of liensinine on hemodynamics in rats and the physiologic properties of isolated rabbit atria [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 1992, 27: 881-885.
- [5] Yu J, Hu WS. Effects of neferine on platelet aggregation in rabbits [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 1997, 32: 1-4.
- [6] Zhang X, Liu Z, Xu B, et al. Neferine, an alkaloid ingredient in lotus seed embryo, inhibits proliferation of human osteosarcoma cells by promoting p38 MAPK-mediated p21 stabilization [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 677: 47.
- [7] Cao JG, Tang XQ, Shi SH. Multidrug resistance reversal in human gastric carcinoma cells by neferine [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10: 3062-3064.
- [8] Sivalingam KS, Paramasivan P, Weng CF, et al. Neferine potentiates the antitumor effect of cisplatin in human lung adenocarcinoma cells via a mitochondria-mediated apoptosis pathway [J]. J Cell Biochem, 2017, 118: 2865-2876.
- [9] Ye ZG, Wang JH, Sun AX, et al. Poteintation of vincristine induced apoptosis by tetrandrine, neferine and dauricine in the human mammary MCF7 multidrug resistant cells [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2001, 36: 96-99.
- [10] Eid W, Abdel-Rehim W. Neferine enhances the antitumor effect of mitomycin-C in HeLa cells through the activation of p38-MAPK pathway [J]. J Cell Biochem, 2017, 118: 3472-3479.
- [11] Yoon JS, Kim HM, Yadunandam AK, et al. Neferine isolated from *Nelumbo nucifera* enhances anti-cancer activities in Hep3B cells: molecular mechanisms of cell cycle arrest, ER stress induced apoptosis and anti-angiogenic response [J]. Phytomedicine, 2013, 20: 1013-1022.
- [12] Wang ZY, Li GS, Huang HX, et al. Causes of death and prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma [J]. Guangdong Med J (广东医学), 2013, 34: 754-757.
- [13] Wang X, Zhu N, Li JC, et al. Effect of triptolide on the expression and function of P-gp in nasopharyngeal cancer cells [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2018, 53: 1107-1112.
- [14] Zhou YJ, Shi J, Tian G, et al. Effect of neferine on proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and Bel-7402 [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2016, 32: 1539-1542.
- [15] Deng G, Zeng S, Ma J, et al. The anti-tumor activities of neferine on cell invasion and oxaliplatin sensitivity regulated by EMT via Snail signaling in hepatocellular carcinoma [J]. Sci Rep, 2017, 7: 41616.
- [16] Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs [J]. Trends Cell Biol, 2008, 18: 505-516.
- [17] Shimizu S, Takehara T, Hikita H, et al. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2010, 52: 698-704.
- [18] Zhou XG, Huang XL, Liang SY, et al. Identifying miRNA and gene modules of colon cancer associated with pathological stage by weighted gene co-expression network analysis [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 2815-2830.
- [19] Stiuso P, Potenza N, Lombardi A, et al. MicroRNA-423-5p promotes autophagy in cancer cells and is increased in serum from hepatocarcinoma patients treated with sorafenib [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2015, 4: e233.
- [20] Lian Y, Xiong F, Yang L, et al. Long noncoding RNA AFAP1-AS1 acts as a competing endogenous RNA of miR-423-5p to facilitate nasopharyngeal carcinoma metastasis through regulating the Rho/Rac pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37: 253.
- [21] Wei SX, Liu CJ, Li MY, et al. Study on the apoptosis induction of Guangxi cobra venom NGF in human nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells [J]. Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2008, 28: 1909-1912.
- [22] Vician L, Silver AL, Farias-Eisner R, et al. NID67, a small putative membrane protein, is preferentially induced by NGF in PC12 pheochromocytoma cells [J]. J Neurosci Res, 2001, 64: 108-120.