

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research汉黄芩素通过 *LncRNA SNHG16/miR-302a-3p/E2F1* 分子轴调控胃癌细胞生物学行为研究Research of baicalin regulates the biological behavior of gastric cancer cells through the *LncRNA SNHG16/miR-302a-3p/E2F1* molecular axis

常毅刚, 霍华英

(山西省人民医院 胃肠胰科, 山西 太原 030012)

CHANG Yi-gang, HUO Hua-ying

(Department of Gastrointestinal and
Pancreatic Surgery, Shanxi Provincial
People's Hospital, Taiyuan 030012, Shanxi
Province, China)基金项目: 山西省中医药管理局科研课题计划
基金资助项目(2024ZYC040)作者简介: 常毅刚(1976-), 男, 主任医师, 主要
从事胃癌、结直肠癌、胰腺癌及后腹
膜肿瘤方面的临床工作和研究通信作者: 霍华英, 主任医师, 硕士生导师
MP: 13753130258

E-mail: gracechang82@163.com

摘要:目的 探讨汉黄芩素(WOG)通过长链非编码核糖核酸小核仁核糖核酸宿主基因16(*LncRNA SNHG16*)/微小核糖核酸(*miR*)-302a-3p/*E2F1*转录因子1(*E2F1*)对胃癌细胞生物学行为的影响。方法 在细胞实验部分,将人胃癌细胞(MGC-803)分为细胞对照组(正常培养)、细胞高剂量实验组($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WOG处理细胞)、oe-NC组(转染oe-NC)、oe-*LncSNHG16*组(转染oe-*LncSNHG16*)、mimic-NC组(转染mimic-NC)、*miR*-302a-3p mimic组(转染*miR*-302a-3p mimic)、汉黄芩素+oe-NC组(在 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WOG处理组基础上转染oe-NC)、汉黄芩素+oe-*SNHG16*组(在 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WOG处理组基础上转染oe-*SNHG16*)和汉黄芩素+oe-*LncSNHG16*+*miR*-302a-3p mimic组(在 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WOG处理组基础上转染oe-*LncSNHG16*和*miR*-302a-3p mimic)。在动物试验部分,在Balb/c雄性裸鼠中建立胃癌皮下移植瘤模型,将建模成功的裸鼠随机分为动物低、中、高剂量试验组(15、30、60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ WOG灌胃处理),动物对照组裸鼠灌胃等体积生理盐水,每组10只。用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)法检测*LncRNA SNHG16*、*miR*-302a-3p和*E2F1*相对表达水平,用细胞计数试剂盒8(CCK-8)法检测细胞存活率,用5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(Edu)法、Transwell法及原位末端转移酶标记技术(TUNEL)法分别检测细胞增殖、侵袭及凋亡情况。结果 在细胞实验部分,细胞对照组、细胞高剂量实验组、mimic-NC组、*miR*-302a-3p mimic组、oe-NC组和oe-*LncSNHG16*组的*LncRNA SNHG16*相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13 、 0.47 ± 0.05 、 1.00 ± 0.10 、 0.81 ± 0.12 、 1.02 ± 0.09 和 3.76 ± 0.41 ,*miR*-302a-3p相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 3.60 ± 0.39 、 1.00 ± 0.09 、 3.74 ± 0.32 、 0.97 ± 0.10 和 0.27 ± 0.03 ,*E2F1* mRNA相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 0.23 ± 0.02 、 1.00 ± 0.10 、 0.33 ± 0.03 、 0.95 ± 0.08 和 2.18 ± 0.25 ,细胞高浓度实验组与细胞对照组相比、*miR*-302a-3p mimic组与mimic-NC组对比、oe-*LncSNHG16*组与oe-NC组相比,上述指标在统计学上差异均有统计学意义($P<0.01$, $P<0.001$)。细胞对照组、细胞高剂量实验组、汉黄芩素+oe-*LncSNHG16*组和汉黄芩素+oe-*LncSNHG16*+*miR*-302a-3p mimic组的细胞增殖率分别为 $(95.04\pm10.14)\%$ 、 $(36.36\pm4.75)\%$ 、 $(97.64\pm11.04)\%$ 和 $(31.87\pm3.56)\%$,侵袭细胞个数分别为 (147.36 ± 15.01) 、 (43.31 ± 6.25) 、 (153.45 ± 15.22) 和 (37.35 ± 5.04) 个,细胞凋亡率分别为 $(7.83\pm0.83)\%$ 、 $(35.77\pm4.38)\%$ 、 $(8.44\pm0.88)\%$ 和 $(29.35\pm3.09)\%$,细胞高剂量实验组的上述指标与细胞对照组比较、汉黄芩素+oe-*LncSNHG16*组的上述指标与实验组比较、汉黄芩素+oe-*LncSNHG16*组的上述指标与汉黄芩素+oe-*LncSNHG16*+*miR*-302a-3p mimic组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。在动物试验部分,动物对照组和动物低、中、高剂量试验组的肿瘤体积分别为 $(2\ 554.50\pm280.41)$ 、 $(2\ 194.10\pm234.22)$ 、 $(1\ 512.40\pm166.75)$ 和 $(1\ 146.20\pm124.32)\ \text{mm}^3$,肿瘤质量分别为 (2.13 ± 0.28) 、 (1.84 ± 0.23) 、 (1.65 ± 0.21) 和 $(1.32\pm0.14)\ \text{g}$,动物低、中、高

剂量实验组的上述指标与动物对照组比较,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。结论 WOG 可以抑制胃癌细胞的增殖和侵袭,并促进其凋亡,这可能与调控 *LncRNA SNHG16/miR - 302a - 3p/E2F1* 轴阻滞细胞周期有关。

关键词:汉黄芩素;长链非编码核糖核酸小核仁核糖核酸宿主基因 16;E2F 转录因子 1;胃癌;细胞周期;增殖;侵袭;凋亡

DOI:10. 13699/j. cnki. 1001 - 6821. 2026. 07. 009

中图分类号:R285. 5 文献标志码: A

文章编号:1001 - 6821(2026)07 - 0954 - 08

Abstract: Objective To explore the effects of wogonostatin (WOG) on the biological behaviors of gastric cancer cells through long non - coding RNA small nucleolar RNA host gene 16 (*LncRNA SNHG16*)/microRNA (*miR*) - 302a - 3p/E2F1 transcription factor 1 (E2F1). **Methods** In cell experiment, human gastric cancer cells (MGC - 803) were divided into cell control group (normal culture), cell experimental - H group ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ WOG treated cells), oe - NC group (transfected oe - NC), oe - *LncSNHG16* group (transfected oe - *LncSNHG16*), mimic - NC group (transfected mimic - NC), *miR* - 302a - 3p mimic group (transfected *miR* - 302a - 3p mimic), WOG + oe - NC group (transfected oe - NC based on $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ WOG treated cells), WOG + oe - *LncSNHG16* group (transfected oe - *LncSNHG16* based on $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ WOG treated cells), WOG + oe - *LncSNHG16* + *miR* - 302a - 3p mimic group (transfection of oe - *LncSNHG16* and *miR* - 302a - 3p mimic on the basis of $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ WOG treatment group). In animal experiment, the subcutaneous transplanted tumor model of gastric cancer was established in BALB/C male nude mice. The nude mice were randomly divided into animal experimental - L, - M and - H dose groups ($15, 30$ and $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ WOG gavage), and the animal control group was gavaged with equal volume of physiological saline, with 10 mice in each group. Real - time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT - PCR) was used to detect the relative expression levels of *LncRNA SNHG16*, *miR* - 302a - 3p and *E2F1*. The cell viability was detected using the cell counting kit 8 (CCK - 8). The cell proliferation, invasion and apoptosis were detected using 5 - ethynyl - 2' - deoxyuridine (Edu), Transwell and in situ terminal transferase labeling technique (TUNEL).

Results In cell experiment, the relative expression levels of *LncRNASNHG16* in cell control group, cell experimental - H group, mimic - NC group, *miR* - 302a - 3p mimic group, oe - NC group and oe - *LncSNHG16* group were 1.00 ± 0.13 , 0.47 ± 0.05 , 1.00 ± 0.10 , 0.81 ± 0.12 , 1.02 ± 0.09 and 3.76 ± 0.41 , respectively; the relative expression levels of *miR* - 302a - 3p were 1.00 ± 0.11 , 3.60 ± 0.39 , 1.00 ± 0.09 , 3.74 ± 0.32 , 0.97 ± 0.10 and 0.27 ± 0.03 , respectively; the relative expression levels of *E2F1* mRNA were 1.00 ± 0.14 , 0.23 ± 0.02 , 1.00 ± 0.10 , 0.33 ± 0.03 , 0.95 ± 0.08 and 2.18 ± 0.25 , respectively. Compared the cell experimental - H group with cell control group, compared *miR* - 302a - 3p mimic group with mimic - NC group and compared oe - *LncSNHG16* group with oe - NC group, the above indicators were all statistically significantly different ($P < 0.01$, $P < 0.001$). The proliferation rates of cell control group, cell experimental - H group, WOG + oe - *LncSNHG16* group and WOG + oe - *LncSNHG16* + *miR* - 302a - 3p mimic group were $(95.04 \pm 10.14)\%$, $(36.36 \pm 4.75)\%$, $(97.64 \pm 11.04)\%$ and $(31.87 \pm 3.56)\%$, respectively; the number of invasive cells were (147.36 ± 15.01) , (43.31 ± 6.25) , (153.45 ± 15.22) and (37.35 ± 5.04) , respectively; the apoptosis rates were $(7.83 \pm 0.83)\%$, $(35.77 \pm 4.38)\%$, $(8.44 \pm 0.88)\%$ and $(29.35 \pm 3.09)\%$, respectively. There were statistically significant differences in the above indexes between the cell experimental - H group and the cell control group, between the WOG + oe - *LncSNHG16* group and the cell experimental - H group, and between the WOG + oe - *LncSNHG16* group and the WOG + oe - *LncSNHG16* + *miR* - 302a - 3p mimic group (all $P < 0.001$). In animal experiment, the tumor volume of animal control group and animal experimental - L, - M, - H groups were $(2\ 554.50 \pm 280.41)$, $(2\ 194.10 \pm 234.22)$, $(1\ 512.40 \pm 166.75)$ and $(1\ 146.20 \pm 124.32) \text{ mm}^3$, respectively; the tumor mass was (2.13 ± 0.28) , (1.84 ± 0.23) , (1.65 ± 0.21) and $(1.32 \pm 0.14) \text{ g}$, respectively. There were statistically significant differences in the above indicators between experimental - L, - M, - H groups and animal control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** WOG can inhibit the proliferation and invasion of gastric cancer cells and promote their apoptosis. This may be related to the regulation of the *LncRNA SNHG16/miR* - 302a - 3p/

E2F1 axis, which blocks the cell cycle.

Key words: woginostatin; long-chain non-coding ribonucleic acid small nucleolar ribonucleic acid host gene 16; E2F transcription factor 1; gastric cancer; cell cycle; proliferation; invasion; apoptosis

胃癌是全球高发且预后较差的消化系统恶性肿瘤,其侵袭转移与化疗耐药是制约疗效的关键瓶颈,因此探索新的治疗靶点与机制至关重要^[1-2]。汉黄芩素(wogonin, WOG)作为天然黄酮类化合物,具有显著抗肿瘤活性,但在胃癌中的具体作用机制仍需进一步研究^[3-4]。已有研究表明,长链非编码核糖核酸小核仁核糖核酸宿主基因16(long non-coding RNA small nucleolar RNA host gene 16, *LncRNA SNHG16*) 在胃癌等多种肿瘤中异常高表达,可作为“分子海绵”吸附微小核糖核酸RNA(microRNA, mRNA); *miR-302a-3p* 参与多种病变如癌症的调节,在多种肿瘤中起抑癌作用;E2F转录因子1(E2F transcription factor 1, E2F1)是调控细胞周期与增殖的关键因子^[5-7]。因此,本研究旨在通过体内外实验,系统阐明WOG通过干预*LncRNA SNHG16*/*miR-302a-3p*/E2F1轴抑制胃癌细胞恶性表型的作用与机制。

材料与方法

1 材料

细胞 人胃癌细胞(HGC-27、MGC-803、MKN-28及MKN-45)、人正常胃黏膜细胞(GES-1)和人胚肾细胞(293T),均购自上海酶联生物科技有限公司。

动物 40只6周龄Balb/c雄性裸鼠,体质量20~25 g,由山西省人民医院提供,动物生产许可证号:SCXK(晋)2024-0002,本研究经山西省人民医院动物伦理委员会批准通过(伦理批号:2025省医科伦审字第380号)。

药品与试剂 WOG,规格:每瓶20 mg,纯度:≥98%,批号:25093001,四川成都曼思特生物科技有限公司生产;Triton X-100、逆转录试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒、细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)、Transwell小室和5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5'-ethynyl-2'-deoxyuridine, Edu)细胞增殖检测试剂盒,均由上海碧云天生物科技有限公司生产;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、细胞周期蛋白D1(cell cycle protein D1, Cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶2(cyclin

dependent kinase 2, CDK2)、B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)抗体和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白G抗体,均由英国Abcam公司生产;原位末端转移酶标记技术(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)检测试剂盒,北京索莱宝公司生产。

仪器 Nikon Eclipse Ti-SR荧光显微镜,日本尼康公司产品;QuanStudio 6荧光定量聚合酶链反应仪,美国Thermo公司产品;Infinite 200PRO酶标仪,瑞士Tecan公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞实验

2.1.1 细胞培养^[8]

细胞用含10%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基,于37℃、5% CO₂培养箱中培养。当融合度达80%~90%时,用胰蛋白酶消化传代。

2.1.2 细胞分组与处理方法

取对数生长期的MGC-803细胞,分为细胞对照组(MGC-803细胞正常培养不做任何处理);细胞低、中、高剂量实验组(分别用20、60、100 μmol·L⁻¹ WOG处理MGC-803细胞);oe-NC组(MGC-803细胞转染oe-NC);oe-*LncSNHG16*组(MGC-803细胞转染oe-*SNHG16*);mimic-NC组(MGC-803细胞转染mimic NC);*miR-302a-3p* mimic组(MGC-803细胞转染*miR-302a-3p* mimic);汉黄芩素+oe-NC组(在100 μmol·L⁻¹处理组基础上转染过表达*LncSNHG16*阴性对照);汉黄芩素+oe-*SNHG16*组(在100 μmol·L⁻¹处理组基础上过表达*LncSNHG16*) 和汉黄芩素+oe-*LncSNHG16*+*miR-302a-3p* mimic组(在WOG+oe-*LncSNHG16*组基础上转入*miR-302a-3p* mimic)。

293T细胞共分为2组,分别为293T mimic-NC组(50 nmol·L⁻¹ mimic-NC处理)和293T *miR-302a-3p* mimic组(50 nmol·L⁻¹ *miR-302a-3p* mimic处理),2组细胞分别与*LncSNHG16* WT、*LncSNHG16* MUT、E2F1 WT和E2F1 MUT质粒共转染。

2.1.3 CCK-8法检测细胞活力^[6]

收集各组细胞,调整细胞悬液浓度为1.0×10⁴ cells·mL⁻¹,接种至96孔板,每孔细胞悬液

100 μL ,于培养箱中常规培养 24 h,待细胞贴壁后,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL ,于培养箱中孵育 2 h,用酶标仪检测 450 nm 波长处的光密度,实验重复 3 次,计算细胞存活率。

2.1.4 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 法检测 *LncRNA SNHG16*、*miR-302a-3p* 和 *E2F1* mRNA 相对表达水平^[9]

用 dbDEMC 数据库和 GEPIA 2 数据库筛查影响胃癌异常表达的基因。用 TRIzol 试剂从细胞中分离总 RNA 并鉴定其纯度及完整性,将总 RNA 反转录为互补 DNA,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达水平。引物序列见表 1。

2.1.5 双荧光素酶报告实验法验证 *LncRNA SNHG16*、*miR-302a-3p* 和 *E2F1* 的关系^[10]

starBase 预测显示, *LncRNA SNHG16* 与 *miR-302a-3p* 存在结合位点, *miR-302a-3p* 与 *E2F1* 存在结合位点。分别构建含有荧光酶素报告基因载体 pGL3 的 *LncSNHG16* WT 和 *LncSNHG16* MUT 重组质粒、*E2F1* WT 和 *E2F1* MUT 重组质粒,并将重组质粒分别与 mimic-NC、*miR-302a-3p* mimic 共转染至 293T 细胞中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱继续培养 48 h,收集并裂解细胞,测定荧光素酶活性。

2.1.6 Edu 实验法检测细胞增殖能力^[11]

将各组转染后的细胞接种至 96 孔板,每孔添加 Edu 溶液 100 μL ,孵育 2 h 后,依据 Edu 细胞增殖检测试剂盒说明书的操作流程完成染色;同时用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)对各组细胞的细胞核进行复染及固定,用荧光显微镜观察并计算细胞增殖率。

2.1.7 Transwell 法检测细胞侵袭能力^[11]

将细胞接种于铺有基质胶的 Transwell 小室上室,

避光孵育 24 h,经 0.5% 结晶紫染色后,用显微镜观察、拍照并完成细胞计数。

2.1.8 TUNEL 染色法检测细胞凋亡率^[11]

重悬细胞至 1×10^5 cells $\cdot$ mL⁻¹ 并培养 24 h,依次洗涤、固定后加入 1% Triton X-100 液,漂洗后加入 TUNEL 染色液室温避光孵育,再次漂洗后染核及封片,用显微镜观察并计算细胞凋亡率。

2.1.9 蛋白免疫印迹法检测 Cyclin D1、CDK2 和 Bax 蛋白表达^[12]

用裂解缓冲液从细胞中提取总蛋白,4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 10 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 15 min,并收集上清液,用二喹啉甲酸法测定蛋白浓度。之后依次行电泳、分离蛋白及转膜,5% 脱脂奶粉中封闭 1 h,洗膜 3 次后,加入 GAPDH、Cyclin D1、CDK2 和 Bax 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后,洗膜除去一抗,再加入辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 2 h。显影定量分析,计算蛋白相对表达水平。

2.2 动物实验

2.2.1 裸鼠皮下移植瘤模型的建立、分组及处理方法^[13]

将 MGC-803 细胞密度调整为 3×10^7 溶解于 0.2 mL 培养基中制成细胞悬液,于裸鼠的右前背部皮下注射。构建胃癌皮下移植瘤模型。将建模成功的裸鼠分为 4 组,分别为动物对照组和动物低、中、高剂量试验组,动物低剂量实验组用 15 mg $\cdot$ kg⁻¹ WOG 灌胃处理,动物中剂量实验组用 30 mg $\cdot$ kg⁻¹ WOG 灌胃处理,动物高剂量试验组用 60 mg $\cdot$ kg⁻¹ WOG 灌胃处理,每日 1 次,连续给药 3 w,对照组进行等量生理盐水灌胃,每组 10 只。每 7 d 测量裸鼠的移植瘤体积,21 d 后,处死小鼠并分离肿瘤,测量肿瘤的质量与体积。

3 统计学处理

用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间用单因素方差分析,进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。

结 果

1 不同胃癌细胞系中 *LncRNA SNHG16*、*miR-302a-3p* 和 *E2F1* 相对表达水平

dbDEMC 数据库显示, *miR-302a-3p* 在胃癌组织中呈现低表达。GEPIA 2 数据库发现, *LncRNA SNHG16* 和 *E2F1* 在胃癌组织中均呈现高表达。qRT-PCR 结果显示,与 GES-1 细胞相比, HGC-27、MGC-803、MKN-28 和 MKN-45 细胞系中 *LncRNA SNHG16* 和 *E2F1* mRNA 的相对表达水平均显著升高

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Gene	Sequences(5'-3')
<i>miR-302a-3p</i>	F:5'-AACCGTAAGTGCTTCATGTTT-3' R:5'-CA GTGCAGGCTCCGAGGT-3'
<i>LncRNA SNHG16</i>	F:5'-CAGAATGCCATGGTTTCCCC-3' R:5'-TGGCAAGAGACTTCCTGAGG-3'
<i>U6</i>	F:5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACA-3' R:5'-ATCCAGTGCAGGTCCGAGG-3'
<i>E2F1</i>	F:5'-GCTGGACCACCTGATGAATATCT-3' R:5'-GGAGGGGCTTTGATCACCATAA-3'
<i>GAPDH</i>	F:5'-CCACAGTCCATGCCATCACTG-3' R:5'-GTCAGGTCCACCACTGACACG-3'

6 WOG 对 MGC-803 细胞中 Cyclin D1、CDK2 和 Bax 蛋白表达的影响

如表 7 和图 2 所示,与细胞对照组相比,细胞高

剂量实验组细胞的 Cyclin D1 和 CDK2 蛋白相对表达水平均显著下降(均 $P < 0.001$), Bax 蛋白相对表达水平显著升高($P < 0.001$);与细胞高剂量实验组相比,

表 4 双荧光素酶报告基因实验($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Dual-luciferase reporter assay($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	LncSNHG16 WT	LncSNHG16 MUT	E2F1 WT	E2F1 MUT
293T mimic-NC	8	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.10
293T miR-302a-3p mimic	8	0.23 ± 0.05***	0.95 ± 0.08	0.67 ± 0.06***	0.97 ± 0.09

Compared with 293T mimic-NC, *** $P < 0.001$.

表 5 各组细胞中 LncRNA SNHG16、miR-302a-3p 和 E2F1 mRNA 相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of the relative expression levels of LncRNA SNHG16, miR-302a-3p and E2F1 mRNA in cells of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	LncRNA SNHG16	miR-302a-3p	E2F1
Cell control	8	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.14
Cell experimental-H	8	0.47 ± 0.05***	3.60 ± 0.39***	0.23 ± 0.02***
mimic-NC	8	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.10
miR-302a-3p mimic	8	0.81 ± 0.12 ^{ΔΔ}	3.74 ± 0.32 ^{ΔΔΔ}	0.33 ± 0.03 ^{ΔΔΔ}
oe-NC	8	1.02 ± 0.09	0.97 ± 0.10	0.95 ± 0.08
oe-LncSNHG16	8	3.76 ± 0.41 ^{###}	0.27 ± 0.03 ^{###}	2.18 ± 0.25 ^{##}

Cell control group: MGC-803 cells were cultured normally without any treatment; Cell experimental-H group: MGC-803 cells were treated with 100 μmol · L⁻¹ WOG; mimic-NC group: MGC-803 cells transfected with mimic-NC; miR-302a-3p mimic group: MGC-803 cells transfected with miR-302a-3p mimic; oe-NC group: MGC-803 cells transfected with oe-NC; oe-LncSNHG16 group: MGC-803 cells transfected with oe-LncSNHG16; Compared with cell control group, *** $P < 0.001$; Compared with mimic-NC group, ^{ΔΔ} $P < 0.01$, ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$; Compared with oe-NC group, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$.

表 6 各组细胞增殖、侵袭及凋亡的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparison of cell proliferation, invasion and apoptosis in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Proliferation rate(%)	Number of invasive cells (units)	Apoptosis rate(%)
Cell control	8	95.04 ± 10.14	147.36 ± 15.01	7.83 ± 0.83
Cell experimental-H	8	36.36 ± 4.75***	43.31 ± 6.25***	35.77 ± 4.38***
WOG + oe-LncSNHG16	8	97.64 ± 11.04 ^{###}	153.45 ± 15.22 ^{###}	8.44 ± 0.88 ^{###}
WOG + oe-LncSNHG16 + miR-302a-3p mimic	8	31.87 ± 3.56 ^{ΔΔΔ}	37.35 ± 5.04 ^{ΔΔΔ}	29.35 ± 3.09 ^{ΔΔΔ}

WOG + oe-LncSNHG16 group: Transfected with oe-LncSNHG16 on the basis of 100 μmol · L⁻¹ WOG treatment; WOG + oe-LncSNHG16 + miR-302a-3p mimic group: Transferring miR-302a-3p mimic on the basis of WOG + oe-LncSNHG16 group; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with experimental-H group, ^{###} $P < 0.001$; Compared with WOG + oe-LncSNHG16 group, ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$.

表 7 各组细胞中细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2) 和 B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Comparison of the relative expression levels of cell cycle protein D1 (Cyclin D1), cyclin dependent kinase 2 (CDK2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) proteins in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Cyclin D1	CDK2	Bax
Cell control	8	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.14
Cell experimental-H	8	0.43 ± 0.08***	0.21 ± 0.04***	3.75 ± 0.62***
WOG + oe-LncSNHG16	8	0.79 ± 0.13 ^{###}	0.67 ± 0.13 ^{###}	1.92 ± 0.36 ^{###}
WOG + oe-LncSNHG16 + miR-302a-3p mimic	8	0.61 ± 0.11 ^{ΔΔ}	0.44 ± 0.08 ^{ΔΔΔ}	2.87 ± 0.51 ^{ΔΔΔ}

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with experimental-H group, ^{###} $P < 0.001$; Compared with WOG + oe-LncSNHG16 group, ^{ΔΔΔ} $P < 0.001$.

汉黄芩素 + oe - LncSNHG16 组的 Cyclin D1 和 CDK2 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$), Bax 蛋白相对表达水平显著下降($P < 0.001$); 与汉黄芩素 + oe - LncSNHG16 组相比, 汉黄芩素 + oe - LncSNHG16 + miR - 302a - 3p mimic 组细胞中 Cyclin D1 和 CDK2 蛋白相对表达水平均显著下降 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), Bax 蛋白相对表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。

7 WOG 对裸鼠胃癌肿瘤生长的影响

在第 21 d, 动物低、中、高剂量实验组的肿瘤体积和肿瘤质量均显著低于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.001$), 且与剂量呈反比, 见表 8。

表 8 不同剂量下 WOG 对胃癌肿瘤生长的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 8 The influence of WOG at different concentrations on the growth of gastric cancer tumors($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose	n	Volume(mm ³)	Weight(g)
Animal control			2 554. 5 ± 280. 41	2. 13 ± 0. 28
Animal experimental - L	15 mg · kg ⁻¹	10	2 194. 10 ± 234. 22 **	1. 84 ± 0. 23 *
Animal experimental - M	30 mg · kg ⁻¹	10	1 512. 40 ± 166. 75 ***	1. 65 ± 0. 21 ***
Animal experimental - H	60 mg · kg ⁻¹	10	1 146. 20 ± 124. 32 ***	1. 32 ± 0. 14 ***

Animal control group: Gavaged with equal volume of physiological saline; Animal experimental - L, - M and - H dose groups: gavaged with 15, 30 and 60 mg · kg⁻¹ WOG, respectively; Compared with the animal control group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

讨 论

胃癌作为全球高发消化系统恶性肿瘤,其高复发转移率和治疗耐药性亟需开发新的治疗策略^[14]。WOG 作为天然黄酮类化合物,其在胃癌中的具体机制,尤其是在 ceRNA 调控网络层面的作用,仍需进一步研究^[15]。ceRNA 网络是肿瘤进展的关键调控环节, LncRNA SNHG16、miR - 302a - 3p 及 E2F1 均参与肿瘤发生发展^[16-17], 但 3 者在胃癌中是否形成调控轴及 WOG 是否通过该轴发挥作用仍需进一步研究。基于此,本研究聚焦 LncRNA SNHG16/miR - 302a - 3p/E2F1 分子轴,探究 WOG 调控胃癌细胞生物学行为的机制,为其临床转化及胃癌靶向治疗提供依据与思路。

从分子机制层面分析, WOG 对胃癌细胞恶性表型的抑制效应可通过 ceRNA 轴的层级调控得到合理解释。康娟等^[18]研究表明, LncRNA SNHG16 作为促癌 LncRNA 在胃癌组织及细胞中高表达,通过调控下游靶分子促进肿瘤增殖、侵袭等恶性表型;杨春等^[19]研究证实, miR - 302a - 3p 在胃癌中呈抑癌性低表达, 可通过靶向抑制 VEGFA 表达阻滞肿瘤细胞增殖与迁移;GAO 等^[20]研究表明, E2F1 作为细胞周期调控核

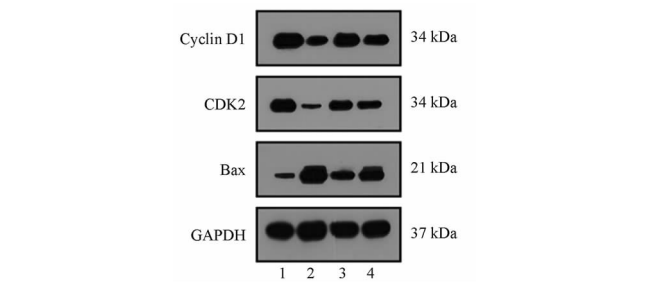


图 2 蛋白质印迹法检测细胞中 Cyclin D1、CDK2 和 Bax 蛋白相对表达水平

Figure 2 The relative expression levels of Cyclin D1, CDK2 and Bax proteins in cells detected by Western blot

1: Cell control group; 2: Cell experimental - H group; 3: WOG + oe - LncSNHG16 group; 4: WOG + oe - LncSNHG16 + miR - 302a - 3p mimic group.

心转录因子,高表达可推动细胞周期进程,与胃癌恶性程度升高及预后不良密切相关。本研究通过荧光素酶实验与功能挽救实验双重验证,确认 miR - 302a - 3p 可以直接靶向 E2F1,抑制其表达,且 WOG 通过此路径下调 E2F1,进而抑制下游 CyclinD1/CDK2 复合物表达并上调促凋亡蛋白 Bax,最终阻滞细胞周期并诱导凋亡。这一分子表达模式与多数胃癌相关 ceRNA 调控网络研究结论一致,如已有研究发现胃癌中促癌 LncRNA 常通过吸附抑癌 miRNA 上调靶癌基因表达^[21]。本研究不仅验证了 LncRNA SNHG16/miR - 302a - 3p/E2F1 轴在胃癌中的存在,更关键的是揭示了 WOG 可通过靶向干预该轴实现抗肿瘤效应,这为理解天然化合物的多靶点调控特性提供了新的分子注解。

细胞增殖失控与侵袭增强、凋亡抑制是胃癌恶性进展的核心特征,其分子机制与细胞周期调控及凋亡通路紊乱密切相关^[22-23]。本研究功能实验与蛋白质印迹法显示, WOG 可抑制胃癌细胞增殖、侵袭并促进凋亡,同时下调 CyclinD1 和 CDK2 表达并上调 Bax 表达,且这一调控效应可以被 LncRNA SNHG16 过表达逆转,补充 miR - 302a - 3p mimic 则可以恢复 WOG 的作用。有研究表明, CyclinD1 与 CDK2 形成复合物

可推动细胞从 G1 期进入 S 期,是促进肿瘤增殖的关键分子,2 者高表达在胃癌中已被证实与肿瘤恶性程度正相关;而 Bax 作为经典促凋亡蛋白,其表达上调可抑制肿瘤进展,胃癌组织中 Bax 低表达常提示预后不良,与本研究结果相符^[24-25]。此外,体内实验证实 WOG 可剂量依赖性抑制移植瘤生长,进一步证实其抗肿瘤活性。但本研究未深入探究 WOG 对肿瘤转移的体内影响及分子轴在体内的调控模式。未来需开展肿瘤转移相关体内实验,同时拓展 WOG 调控的其他信号通路,为其临床转化提供更全面的依据。本研究仍存在一定局限性,研究主要集中于 1 条 ceRNA 通路,WOG 作为多靶点药物,可能还存在其他信号网络,未来需结合转录组学、蛋白质组学进行全局探索,且 WOG 调控 *SNHG16* 表达的上游机制尚未涉及,值得深入探究。WOG 可能通过类似机制影响其他消化系统肿瘤,建议后续研究拓展其他瘤种,以全面评估其多靶点协同抗肿瘤机制,加速向临床应用的转化进程。

本研究提示:WOG 可以抑制胃癌细胞的增殖和侵袭,并促进其凋亡,这可能与调控 *LncRNA SNHG16/miR-302a-3p/E2F1* 轴阻滞细胞周期有关。

参考文献:

- [1] 马科文,赵强,代春燕,等. 中药抑制胃癌血管生成的作用机制研究进展[J]. 世界中医药,2025,20(7):1233—1239.
- [2] 吕文瑶,李琳,许崇安. 长链非编码 RNA *SOCS2-AS1* 通过 Hippo-YAP 信号通路调控胃癌细胞增殖和侵袭迁移的机制研究[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(24):3618—3622.
- [3] 于利凯,苏子珊,刘尚齐,等. 基于机械应力介导的 *PINK1/Parkin* 途径探讨汉黄芩素改善膝骨关节炎软骨损伤的作用机制[J]. 中草药,2025,56(22):8188—8200.
- [4] 吴轲,陈思琦,姜晨晨,等. 基于网络药理学、分子对接和实验验证探讨汉黄芩素抗非小细胞肺癌的作用机制[J]. 中药新药与临床药理,2025,36(3):416—424.
- [5] 杨丰帅,邱东达,杨运泉,等. *LncRNA SNHG16* 靶向调控 *miR-516a-5p* 对结直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响[J]. 实用医学杂志,2023,39(20):2591—2596.
- [6] 余丽,周铁军,吴晓,等. 微小 RNA-302a-3p 靶向溶酶体相关膜蛋白 5 抑制口腔鳞状细胞癌侵袭转移的研究[J]. 华西口腔医学杂志,2025,43(4):547—558.
- [7] LIN X, HAN T, XIA Q, et al. CHPF promotes gastric cancer tumorigenesis through the activation of *E2F1* [J]. *Cell Death Dis*, 2021,12(10):876.
- [8] 刘耿,李永坤,刘洪峰. *miR-106a-5p* 靶向 *ERK2* 逆转胃癌细胞 *MGC-803* 对顺铂化疗的耐药性[J]. 安徽医科大学学报,2020,55(5):722—728.
- [9] 杨绪莉,王蕾,黄实仁,等. *LncRNA PSMA3-AS1* 调节 *miR-340-5p/TFAM* 轴对肺癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响[J]. 医学研究与战创伤救治,2025,38(7):692—699.
- [10] 李娜,李浩,林坤,等. *LncRNA FGD5-AS1* 通过调节 *miR-302b-3p/E2F1* 轴对胃癌细胞迁移及侵袭的影响[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(24):3065—3076.
- [11] 何秀堂,胡鹏,刘茂年. *INKA2-AS1* 促进肝细胞癌迁移、侵袭和巨噬细胞相关免疫抑制机制研究[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(17):2039—2052.
- [12] 朱琳,王敦方,冯雪,等. 黄芩汤对结肠炎相关性结肠肠道炎症和增殖的干预机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(22):1—10.
- [13] 李佳,陈伟霞,李朝燕,等. 胃肠安颗粒剂与汤剂抑制人胃癌裸鼠皮下移植瘤生长、淋巴结转移作用比较及对 *RUFY3*, *SNAI1*, *VEGF* 和 *EMT* 蛋白的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(5):92—97.
- [14] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209—249.
- [15] 张雨涵,熊鑫,赵印涛,等. 汉黄芩素通过调控 *LncRNA SNHG3* 影响骨肉瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡[J]. 中药材,2024,47(12):3120—3125.
- [16] 柳扬,范伟,丁洁. *LncRNA SNHG16* 通过调控 *miR-570* 对肝癌细胞索拉非尼耐药的机制研究[J]. 中国比较医学杂志,2023,33(11):63—70.
- [17] 任亚丽,吴伟,邵建华,等. *miR-302a-3p* 在食管鳞癌中的表达及临床意义[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2022,43(6):87—93.
- [18] 康娟,贺娇,任伟宏. *LncRNA SNHG16* 通过调控 *miR-195-5p/MYB* 促进胃癌细胞增殖及迁移[J]. 安徽医科大学学报,2023,58(9):1564—1571,1579.
- [19] 杨春,邓绍平. *has-miR-302a-3p* 靶向 *VEGFA* 抑制胃癌细胞增殖的机制研究[J]. 四川大学学报(医学版),2019,50(1):13—19.
- [20] GAO S, BU X, GAO Y, et al. The *miR-532-E2F1* feedback loop contributes to gastric cancer progression [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4):376.
- [21] 贺娇,任伟宏. *LncRNA NEAT1* 通过抑制 *has-miR-450b-5p* 促进胃癌细胞中 *EZH2* 的表达与细胞的增殖和迁移能力[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2024,31(2):135—145.
- [22] 张诺,张震,张雨路,等. *PCID2* 在胃癌组织中高表达并通过调控细胞周期进程和增殖影响患者预后[J]. 南方医科大学学报,2024,44(2):324—332.
- [23] 王珮娜,陈奇峰,霍艺萱,等. 五氟利多通过 *HSP90/Akt/MDM2/p53* 信号通路抑制胃癌细胞生物学行为的研究[J]. 药学报,2025,60(8):2528—2534.
- [24] 史珂,刘东洋,符明诗,等. 青蒿琥酯抑制胃癌细胞的作用机制(英文)[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2021,42(4):441—450.
- [25] 左娇娇,宋瑞平,豆鹏程,等. 制菱扶胃丸调控 *miRNA-21/Bcl-2* 通路改善胃癌前病变大鼠线粒体凋亡的作用机制[J]. 中国中药杂志,2025,50(15):4342—4351.

(本文编辑:马凌云 收稿日期 2026-03-17)