

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research车前子苷抑制非小细胞肺癌生长和转移的研究
Research of plantamajoside on the growth and metastasis of
non-small cell lung cancer朱和平^{1a}, 叶 鸣^{1a}, 陈 群^{1a},
查名宝^{1b}(1. 芜湖市中医医院, a. 药剂科; b. 肿瘤科,
安徽 芜湖 241000)ZHU He-ping^{1a}, YE Ming^{1a},
CHEN Qun^{1a}, ZHA Ming-bao^{1b}(1. a. Pharmacy Department; b. Oncology
Department, Wuhu Hospital of
Traditional Chinese Medicine, Wuhu
241000, Anhui Province, China)

作者简介:朱和平(1980-),男,副主任药师,主
要从事药物研究方面的工作
通信作者:查名宝,副主任中医师,硕士生导师
MP:18855352229
E-mail:953525230@qq.com

摘要:目的 探讨车前子苷(PMS)影响非小细胞肺癌(NSCLC)生长和转移的调控机制。方法 将A549细胞分为对照组(正常培养)、实验组($40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMS)、NC inhibitor组($40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMS + NC inhibitor)、miR-525-5p inhibitor组($40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor)、sh-NC组($40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor + sh-NC)、sh-泛素结合酶E2C(UBE2C)组($40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor + sh-UBE2C)。用穿透小室实验检测细胞的侵袭能力;用原位末端转移酶标记法检测细胞凋亡情况。将小鼠注射A549细胞悬液($5\times 10^6/100\text{ }\mu\text{L}$)以构建NSCLC模型,随机分为动物模型组、PMS组($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PMS)、动物miR-525-5p inhibitor组($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor)、动物sh-UBE2C组($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor + sh-UBE2C),均每天给药1次,连续给药5 d。每7 d用直尺测量各组小鼠移植瘤的体积大小,第28天取出移植瘤并称质量。结果 对照组、实验组、NC inhibitor组、miR-525-5p inhibitor组、sh-NC组和sh-UBE2C组的Transwell侵袭数目分别为(173.62 ± 23.46)、(82.05 ± 14.17)、(84.69 ± 13.82)、(143.48 ± 19.81)、(139.57 ± 18.24)和(105.93 ± 16.25)个,细胞凋亡率分别为(22.65 ± 4.01)%、(53.34 ± 8.93)%、(51.46 ± 8.81)%、(37.52 ± 5.86)%、(34.83 ± 5.27)%和(48.75 ± 6.19)%,实验组的上述指标与对照组比较、miR-525-5p inhibitor组的上述指标与NC inhibitor组比较、sh-UBE2C组的上述指标与sh-NC组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。在动物水平上,动物模型组、PMS组、动物miR-525-5p inhibitor组和动物sh-UBE2C组第28天肿瘤体积分别为(966.30 ± 176.53)、(495.70 ± 52.40)、(841.10 ± 121.25)和(623.80 ± 105.85) mm^3 ,第28天肿瘤质量分别为(1.43 ± 0.52)、(0.75 ± 0.21)、(1.32 ± 0.43)和(0.85 ± 0.26)g,PMS组的上述指标与动物模型组比较,动物sh-UBE2C组的上述指标与动物miR-525-5p inhibitor组比较,在统计学上差异均有统计学意义($P<0.01$, $P<0.001$)。结论 PMS能通过调控miR-525-5p/UBE2C轴显著抑制NSCLC的生长和转移。

关键词:车前子苷;微小核糖核酸-525-5p/泛素结合酶E2C分子轴;非小细胞肺癌;生长;转移;机制

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.11.009

中图分类号:R28 文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)11-1544-06

Abstract: Objective To investigate the regulatory mechanism of plantamajoside (PMS) on the growth and metastasis of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** A549 cells were divided into control group (normal culture), model group ($40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMS), NC inhibitor group ($40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMS + NC inhibitor), miR-525-5p inhibitor group ($40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor), sh-NC group ($40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor + sh-NC) and sh-UBE2C group ($40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor + sh-UBE2C). Transwell invasion assay was used to detect the invasive ability of cells, and in situ terminal transferase labeling method was used to detect cell apoptosis. A549 cell suspension ($5\times 10^6/100\text{ }\mu\text{L}$) was injected into mice to construct NSCLC model, and mice were randomly divided into animal model group, PMS group ($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PMS), animal miR-525-5p inhibitor group ($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor) and animal sh-UBE2C group ($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor + sh-UBE2C). Mice were given 1 dose of medicine every day for 5 days. The volume of tumor transplanted in each group of mice was measured with a ruler every 7 days, and the tumor was removed and weighed on the 28th day. The results showed that the Transwell invasion numbers of the control group, experimental group, NC inhibitor group, miR-525-5p inhibitor group, sh-NC group and sh-UBE2C group were (173.62 ± 23.46), (82.05 ± 14.17), (84.69 ± 13.82), (143.48 ± 19.81), (139.57 ± 18.24) and (105.93 ± 16.25) respectively, and the cell apoptosis rates were (22.65 ± 4.01)%, (53.34 ± 8.93)%, (51.46 ± 8.81)%, (37.52 ± 5.86)%, (34.83 ± 5.27)% and (48.75 ± 6.19)% respectively. The above indicators of the experimental group compared with the control group, the above indicators of the miR-525-5p inhibitor group compared with the NC inhibitor group, the above indicators of the sh-UBE2C group compared with the sh-NC group, the differences were statistically significant (all $P<0.05$). At the animal level, the tumor volume of the animal model group, PMS group, animal miR-525-5p inhibitor group and animal sh-UBE2C group on the 28th day were (966.30 ± 176.53), (495.70 ± 52.40), (841.10 ± 121.25) and (623.80 ± 105.85) mm^3 respectively, and the tumor mass was (1.43 ± 0.52), (0.75 ± 0.21), (1.32 ± 0.43) and (0.85 ± 0.26) g respectively. The above indicators of the PMS group compared with the animal model group, the above indicators of the sh-UBE2C group compared with the animal miR-525-5p inhibitor group, the differences were statistically significant ($P<0.01$, $P<0.001$). **Conclusion** PMS can significantly inhibit the growth and metastasis of NSCLC by regulating the miR-525-5p/UBE2C axis.

and sh-ubiquitin conjugating enzyme E2C (UBE2C) group ($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor + sh-UBE2C). Transwell assay was used to evaluate the invasion ability of A549 cells after different treatments. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling assay was used to evaluate the apoptosis of A549 cells after different treatments. At the animal level, mice were injected with A549 cell suspension ($5 \times 10^6/100 \mu\text{L}$) to construct the NSCLC model. They were randomly divided into model-M group, PMS group ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PMS), miR-525-5p inhibitor-M group ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor) and sh-UBE2C-M group ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor + sh-UBE2C). All groups were treated for 5 days with once a day. The size of the transplanted tumor was measured with a ruler every 7 days, and the transplanted tumor was removed and weighed on the 28th day. The number of Transwell invasions in control group, model group, NC inhibitor group, miR-525-5p inhibitor group, sh-NC group and sh-UBE2C group were 173.62 ± 23.46 , 82.05 ± 14.17 , 84.69 ± 13.82 , 143.48 ± 19.81 , 139.57 ± 18.24 and 105.93 ± 16.25 , respectively; the apoptosis rates were $(22.65 \pm 4.01)\%$, $(53.34 \pm 8.93)\%$, $(51.46 \pm 8.81)\%$, $(37.52 \pm 5.86)\%$, $(34.83 \pm 5.27)\%$ and $(48.75 \pm 6.19)\%$, respectively. Compared in model group and control group, compared in miR-525-5p inhibitor group and NC inhibitor group, compared in sh-UBE2C group and sh-NC group, there were significant differences in the number of Transwell invasion and apoptosis rates (all $P < 0.05$). At the animal level, 28 d tumor volumes of model-M group, PMS group, miR-525-5p inhibitor-M group and sh-UBE2C-M group were (966.30 ± 176.53) , (495.70 ± 52.40) , (841.10 ± 121.25) and $(623.80 \pm 105.85) \text{ mm}^3$, respectively; the tumor weight on day 28 were (1.43 ± 0.52) , (0.75 ± 0.21) , (1.32 ± 0.43) and $(0.85 \pm 0.26) \text{ g}$, respectively. Differences of the tumor volume and weight between PMS group and model-M group, sh-UBE2C-M group and miR-525-5p inhibitor-M group were statistically significant at the 28th day ($P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** PMS can significantly inhibit the growth and metastasis of NSCLC by regulating the miR-525-5p/UBE2C axis.

Key words: plantamajoside; microRNA-525-5p/ubiquitin-conjugating enzyme 2C molecular axis; non-small cell lung cancer; proliferation; invasion; mechanism

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 作为肺癌的常见类型, 发病率约占肺癌的 85%, 西医多用手术、放化疗、靶向治疗、免疫治疗等手段, 但易产生药物不良反应影响患者的生活质量^[1]。中药因药物不良反应轻微、治疗恶性肿瘤疗效佳等优点逐渐引起肿瘤学术界的关注^[2]。车前子苷 (plantamajoside, PMS) 是提取于中药车前草的活性成分, 相关研究表明, PMS 能明显抑制膀胱癌、宫颈癌等肿瘤细胞的增殖和转移^[3]。泛素结合酶 E2C (ubiquitin conjugating enzyme E2C, UBE2C) 是泛素蛋白酶体系统的关键成分, 在多种恶性肿瘤中表达上调^[4]。研究指出, UBE2C 与肿瘤的发生、增殖、侵袭和凋亡密切相关^[5]。本研究通过建立 NSCLC 细胞及动物模型, 旨在探讨 PMS 影响 NSCLC 生长和转移的作用机制, 以期对 NSCLC 的靶向治疗提供新的治疗策略。

材料与方法

1 材料

动物 无特定病原体 (specific pathogen free,

SPF) 级别雄性 BALB/c 裸鼠 40 只, 鼠龄 4 周, 体质量 18~22 g, 安徽医科大学提供。动物生产许可证号: SCXK(皖)2022-001。本实验经芜湖市中医医院动物伦理委员会批准 (伦理批号: 20240130)。

细胞 人非小细胞肺癌细胞 (A549)、人胚肾细胞 (HEK 293T), 均购自上海思泰默生物科技有限公司。

药品与试剂 PMS, 规格: 每瓶 20 mg, 纯度: 99.26%, 批号: 350847, 美国 MCE 公司生产。微小核糖核酸-525-5p 抑制剂 (microRNA-525-5p inhibitor, miR-525-5p inhibitor)、阴性对照抑制剂 (negative control inhibitor, NC inhibitor)、miR-525-5p 模拟物 (miR-525-5p mimics)、阴性对照模拟物 (negative control mimics, NC mimics), 均为上海汉恒生物生产; Trizol 试剂, 美国 Invitrogen 公司生产; 4% 多聚甲醛溶液, 南京森贝伽生物科技有限公司生产; 胎牛血清, 上海翌圣生物科技有限公司生产; 胰酶、青霉素-链霉素、实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测试剂盒, 均为美国 Thermo Fisher Scientific 公司生产; 荧光素酶活性检测试剂盒, 均为北京索莱宝科技有限公

司生产; Lipofectamine™ 2000 试剂盒, 美国 Invitrogen 公司生产; 4', 6 - 二脒基 - 2 - 苯基吲哚 (4', 6 - diamidino - 2 - phenylindole, DAPI) 染色液、原位末端转移酶标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 细胞凋亡检测试剂盒, 均为上海碧云天生物技术有限公司生产; *miR - 525 - 5p*、*UBE2C*、甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)、U6 小核 RNA (U6 small nuclear RNA primer, U6) 引物以及 sh - NC、sh - *UBE2C*, 均为上海生工生物有限公司合成。

仪器 C - 1000 qRT - PCR 仪、043BR50095 电泳仪、ChemiDoc XRS 凝胶成像系统, 均为美国 Bio - Rad 公司产品; Multiskan GO 多功能酶标仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品; IX53 荧光显微镜, 日本 Nikon 公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞实验

2.1.1 细胞培养^[6]

HEK 293T 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和 1% 链霉素的杜氏改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM) 培养, 细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养; A549 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和 1% 链霉素的 RPMI 1640 培养基培养, 细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞汇合率达到 80% 以上时用胰酶消化收取, 进行实验。

2.1.2 细胞分组与给药方法

取对数生长的 A549 细胞, 随机分为对照组、实验组、NC inhibitor 组、*miR - 525 - 5p* inhibitor 组、sh - NC 组、sh - *UBE2C* 组, 其中实验组给予 40 μg · mL⁻¹ PMS 孵育细胞, NC inhibitor 组给予 40 μg · mL⁻¹ PMS + 转染 NC inhibitor, *miR - 525 - 5p* inhibitor 组给予 40 μg · mL⁻¹ PMS + 转染 *miR - 525 - 5p* inhibitor 细胞, sh - NC 组给予 40 μg · mL⁻¹ PMS + 转染 *miR - 525 - 5p* inhibitor + sh - NC, sh - *UBE2C* 组给予 40 μg · mL⁻¹ PMS + 转染 *miR - 525 - 5p* inhibitor 和 sh - *UBE2C* 孵育细胞, 对照组正常培养。其中, sh - NC 序列: 5' - TTCTCCGAACGTGTCACGT - 3'、sh - *UBE2C* 序列: 5' - TGTATGATGTCAGGACCATTTC - 3'。

2.1.3 双荧光素酶实验体外验证 *UBE2C* 和 *miR - 525 - 5p* 的靶标关系^[7]

用 starBase 数据库预测 *UBE2C* 和 *miR - 525 - 5p* 的靶标关系。构建 *UBE2C* - WT 和 *UBE2C* - MUT 质

粒, 并分别提取 *UBE2C* - WT 和 *UBE2C* - MUT 质粒。用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒将 *UBE2C* - WT 与 *UBE2C* - MUT 质粒分别与 NC mimics 和 *miR - 525 - 5p* mimics 共转染至 HEK 293T 细胞中, 待转染 24 h 后, 收集各孔细胞并裂解, 以 350 × g 离心 10 min, 取上清液 20 μL, 并加入萤火虫荧光素酶反应液 100 μL, 混合均匀后, 测定荧光素酶活性。

2.1.4 qRT - PCR 检测 A549 细胞经不同处理后细胞中 *miR - 525 - 5p* 和 *UBE2C* 的 mRNA 相对表达水平^[7]

取处理后的 A549 细胞, 用 Trizol 试剂提取不同处理组细胞总 RNA, 依次反转录与扩增。循环参数: 95 °C 10 min、95 °C 15 s、60 °C 1 min, 扩增 40 个循环。以 *GAPDH* 和 U6 作为内参, 检测不同处理组细胞 *miR - 525 - 5p* 和 *UBE2C* 的 mRNA 相对表达水平。用 2^{-ΔΔCt} 法进行相对定量分析。

2.1.5 Transwell 实验评估 A549 细胞经不同处理后的侵袭能力^[8]

将分装的基质胶放于 4 °C 冰箱融化, 取出小室, 将基质胶用 RPMI 1640 培养基按照 1:8 的比例稀释, 并于每个小室内加入 100 μL, 37 °C 孵育 1 ~ 2 h, 待基质胶凝固后, 于 24 孔板中加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 800 μL, A549 细胞按“2.1.2”中处理, 取 RPMI 1640 完全培养基 1 mL 重悬细胞, 取出细胞悬液 200 μL 接种于小室内, 置于 37 °C 培养箱中培养 24 h, 取出孔板, 吸弃孔板内培养基, 每孔加入 4% 多聚甲醛 800 μL, 将小室放于其中, 固定细胞 15 min, 清洗小室 2 次, 再每孔加入 1% 结晶紫 800 μL 染色 15 min, 清洗小室 1 次, 将小室倒扣晾干, 拍照记录并分析数据。

2.1.6 TUNEL 实验评估 A549 细胞经不同处理后细胞凋亡情况^[7]

按“2.1.2”处理细胞, 按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作, 加入 TUNEL 染色液避光孵育 1 h, DAPI 避光染核 10 min。用封片液封片, 用荧光显微镜观察拍照, 计算细胞凋亡率。细胞凋亡率 (%) = TUNEL 阳性细胞数/总细胞数 × 100%。

2.2 动物实验

2.2.1 模型构建^[6]

将 40 只 SPF 级别雄性 BALB/c 小鼠适应性饲喂 1 周后均进行制备非小细胞肺癌模型, 模型制备步骤如下: 收集对数生长期且融合度达 80% 的 A549 细胞, 加入磷酸盐缓冲液将细胞重悬成 5 × 10⁶/100 μL 密度的细胞悬液, 冰上保存备用。75% 乙醇消毒小鼠右侧腋窝中后部皮肤, 用 1 mL 注射器将细胞悬液 100 μL

沿皮下注射至小鼠右侧腋窝中后部,缓慢退出针头,用棉签轻轻按压小鼠皮肤进针点 30 s,防止细胞悬液外渗。

2.2.2 动物分组与给药方法

将模型制备成功的 40 只小鼠随机分为动物模型组、PMS 组、动物 miR-525-5p mimics 组、动物 sh-UBE2C 组,每组 10 只。动物模型组:造模后 24 h 开始通过腹腔注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 0.9% NaCl,每天 1 次,连续给药 5 d;PMS 组:造模后 24 h 开始通过腹腔注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PMS,每天 1 次,连续给药 5 d;动物 miR-525-5p inhibitor 组:基于 PMS 组,尾静脉注射 miR-525-5p inhibitor,每天 1 次,连续给药 5 d;动物 sh-UBE2C 组:基于动物 miR-525-5p inhibitor 组,尾静脉注射 sh-UBE2C,每天 1 次,连续给药 5 d。

2.2.3 测量各组小鼠移植瘤的体积大小^[8]

构建小鼠移植瘤模型,每 7 d 用直尺测量各组小鼠移植瘤的长径和短径,按照公式:体积 = 长径 $\times$ 短径² $\div$ 2,计算并记录各组小鼠移植瘤体积,直至第 28 天。第 28 天,处死各组小鼠,剥离肿瘤,称量并记录各组小鼠移植瘤质量。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用独立样本 *t* 检验。

结 果

1 体外验证 UBE2C 是 miR-525-5p 的直接靶标

starBase 数据库发现 UBE2C 是 miR-525-5p 的潜在靶标,见图 1。miR-525-5p inhibitor 组和 NC inhibitor 组的 miR-525-5p 相对表达水平分别为 0.34 ± 0.08 和 1.00 ± 0.15 ,UBE2C mRNA 相对表达水平为 1.96 ± 0.28 和 1.00 ± 0.17 ,miR-525-5p inhibitor 组细胞中 miR-525-5p 和 UBE2C mRNA 的相对表达水平与 NC inhibitor 组比较,在统计学上差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。NC mimics 组与 miR-525-5p mimics 组的 UBE2C WT 荧光素酶活性分别为 2.36 ± 0.15 和 1.69 ± 0.12 ,UBE2C MUT 荧光素酶活性分别为 2.28 ± 0.18 和 2.24 ± 0.16 ,miR-525-5p mimics 组 UBE2C WT 荧光素酶活性与 NC mimics 组比较,在统计学上差异有统计学意义($P < 0.05$),而 miR-525-5p mimics 组中 UBE2C MUT 荧光素酶活性与 NC mimics 组比较,在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$)。

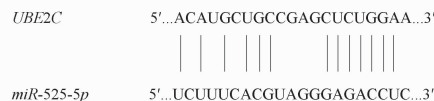


图 1 starBase 预测泛素结合酶 E2C (UBE2C) 和微小核糖核酸 (miR) -525-5p 的靶向关系及结合位点关系图

Figure 1 Target relationship and binding site relationship between ubiquitin conjugating enzyme E2C (UBE2C) and microRNA (miR) -525-5p predicted by starBase

2 PMS 对 A549 细胞中 miR-525-5p/UBE2C 表达的影响

实验组给予 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMS 孵育细胞,NC inhibitor 组给予 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMS 和 NC inhibitor 孵育细胞,miR-525-5p inhibitor 组给予 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMS 和 miR-525-5p inhibitor 孵育细胞,sh-NC 组给予 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMS、miR-525-5p inhibitor 和 sh-NC 孵育细胞,sh-UBE2C 组给予 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMS、miR-525-5p inhibitor 和 sh-UBE2C 孵育细胞,对照组正常培养。

对照组、实验组、NC inhibitor 组、miR-525-5p inhibitor 组、sh-NC 组和 sh-UBE2C 组的 miR-525-5p 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 2.43 ± 0.29 、 2.25 ± 0.26 、 1.61 ± 0.21 、 1.68 ± 0.23 和 2.17 ± 0.25 ,UBE2C mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 0.57 ± 0.08 、 0.62 ± 0.09 、 0.94 ± 0.12 、 0.96 ± 0.13 和 0.71 ± 0.10 ,实验组细胞中 miR-525-5p 和 UBE2C mRNA 的相对表达水平与对照组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);miR-525-5p inhibitor 组细胞中 miR-525-5p 和 UBE2C mRNA 的相对表达水平与 NC inhibitor 组比较,在统计学上差异有统计学意义(均 $P < 0.05$);sh-UBE2C 组 miR-525-5p 和 UBE2C mRNA 的相对表达水平与 sh-NC 组比较,在统计学上差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 PMS 通过调控 miR-525-5p/UBE2C 轴影响 A549 细胞的凋亡与侵袭

对照组、实验组、NC inhibitor 组、miR-525-5p inhibitor 组、sh-NC 组和 sh-UBE2C 组 Transwell 侵袭数目分别为 (173.62 ± 23.46)、(82.05 ± 14.17)、(84.69 ± 13.82)、(143.48 ± 19.81)、(139.57 ± 18.24) 和 (105.93 ± 16.25) 个,细胞凋亡率分别为 (22.65 ± 4.01)%、(53.34 ± 8.93)%、(51.46 ± 8.81)%、(37.52 ± 5.86)%、(34.83 ± 5.27)% 和 (48.75 ± 6.19)%。实验组细胞侵袭个数、细胞凋亡率与对照组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);

miR-525-5p inhibitor 组细胞侵袭个数、细胞凋亡率与 NC inhibitor 组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);sh-UBE2C 组细胞侵袭个数、细胞凋亡率与 sh-NC 组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图 2。

4 PMS 通过调控 miR-525-5p/UBE2C 轴抑制小鼠皮下移植瘤生长

动物模型组:造模后 24 h 开始通过腹腔注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 0.9% NaCl;PMS 组:造模后 24 h 开始通过腹腔注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PMS;动物 miR-525-5p inhibitor 组:基于 PMS 组,尾静脉注射 miR-525-5p inhibitor;动物 sh-UBE2C 组:基于动物 miR-525-5p

inhibitor 组,尾静脉注射 sh-UBE2C,各组均每天给药 1 次,连续给药 5 d。

动物模型组、PMS 组、动物 miR-525-5p inhibitor 组和动物 sh-UBE2C 组小鼠移植瘤生长情况见表 1。第 28 天时,PMS 组小鼠皮下移植瘤的体积与质量与动物模型组比较,在统计学上差异有统计学意义($P < 0.01, P < 0.001$);动物 miR-525-5p inhibitor 组小鼠皮下移植瘤的体积与质量与 PMS 组比较,在统计学上差异有统计学意义($P < 0.01, P < 0.001$);动物 sh-UBE2C 组小鼠皮下移植瘤的体积与质量与动物 miR-525-5p inhibitor 组比较,在统计学上差异有统计学意义($P < 0.01, P < 0.001$)。

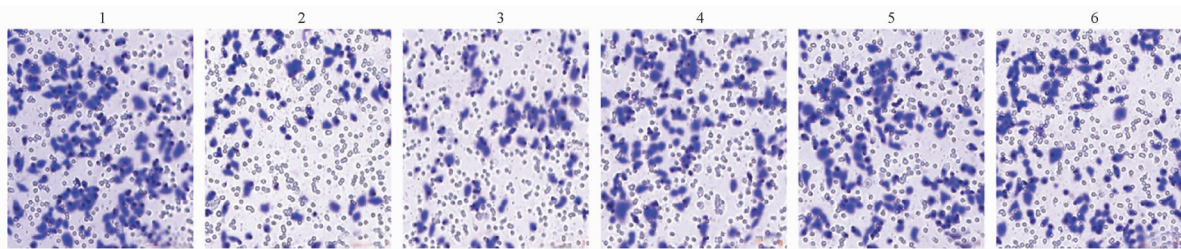


图 2 车前子苷(PMS)通过调控 miR-525-5p/UBE2C 轴影响 A549 细胞的侵袭($\times 100$)

Figure 2 Plantamajoside (PMS) affects invasion of A549 cells by regulating the miR-525-5p/UBE2C axis($\times 100$)

1: Control group, $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMS incubated A549 cells; 2: Model group, $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMS incubated A549 cells; 3: NC inhibitor group, $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMS + NC inhibitor incubated A549 cells; 4: miR-525-5p inhibitor group, $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor incubated A549 cells; 5: sh-NC group, $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor + sh-NC incubated A549 cells; 6: sh-UBE2C group, $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor + sh-UBE2C incubated A549 cells.

表 1 不同组别处理对非小细胞肺癌肿瘤生长的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of different treatment groups on the growth of non-small cell lung cancer ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Volume (mm^3)				Weight (g)
		7 d	14 d	21 d	28 d	28 d
Model - M	10	148.30 ± 23.82	255.20 ± 74.39	607.50 ± 152.37	966.30 ± 176.53	1.43 ± 0.52
PMS	10	154.60 ± 26.37	241.10 ± 82.74	$438.20 \pm 106.58^*$	$495.70 \pm 52.40^{***}$	$0.75 \pm 0.21^{**}$
miR-525-5p inhibitor - M	10	139.70 ± 19.06	259.30 ± 76.52	$562.90 \pm 131.73^\#$	$841.10 \pm 121.25^{###}$	$1.32 \pm 0.43^{##}$
sh-UBE2C - M	10	144.80 ± 24.54	273.40 ± 86.76	454.30 ± 129.64	$623.80 \pm 105.85^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.85 \pm 0.26^{\Delta\Delta}$

PMS: Plantamajoside; Model - M group: 0.9% NaCl; PMS group: $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PMS; miR-525-5p inhibitor - M group: $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor; sh-UBE2C - M group: $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PMS + miR-525-5p inhibitor + sh-NC inhibitor + sh-UBE2C; Compared with model - M group, $^* P < 0.05, ^{**} P < 0.01, ^{***} P < 0.001$; Compared with PMS group, $^\# P < 0.05, ^{##} P < 0.01, ^{###} P < 0.001$; Compared with miR-525-5p inhibitor - M group, $^{\Delta\Delta} P < 0.01, ^{\Delta\Delta\Delta} P < 0.001$.

讨 论

miR-525-5p 在多种癌症中发挥抑癌作用。左伟等^[9]研究发现,miR-525-5p 具有抑制胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移的作用。刘盈等^[10]研究发现,UBE2C 在肺腺癌组织中上调,且其高表达水平与患者预后较差有关。ZHANG 等^[11]研究发现,UBE2C 通过

钙黏蛋白 1/含 DEP 结构域的西罗莫司相互作用蛋白轴调控肺癌细胞周期进程与自噬,发挥促癌作用,在小鼠肺癌模型中,UBE2C 缺失可抑制肺癌发生,延长小鼠寿命。PMS 是车前草中的主要成分,具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化活性^[12]。本研究的细胞实验和小鼠模型实验结果也证实了 PMS 的抗 NSCLC 作用。此外,本研究还通过实验验证了 UBE2C 是 miR-525-5p 的直接靶标,即 miR-525-5p 可靶向负调控 UBE2C,并

且 PMS 处理可升高 A549 细胞 *miR*-525-5p 水平,降低 UBE2C 水平,这提示 PMS 可能通过调控 *miR*-525-5p/UBE2C 轴发挥抗癌作用。

在张博达等^[13]研究中,冬凌草素具有抑制 NSCLC 活性的作用,其可下调微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3-I、微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3-II、 β -微管素 1 表达,增加整合体 1 表达,减少细胞自噬而诱发细胞凋亡。丁万盛等^[14]研究发现,华蟾素可下调无翅型 MMTV 整合位点家族成员 4 和 β -连环蛋白水平,抑制 NSCLC 细胞侵袭和增殖。黄健等^[15]研究发现,敲低丝氨酸蛋白酶 3 通过调控成纤维细胞生长因子受体 2,影响 Janus 激酶信号通路激活和程序性死亡配体 1 表达,从而减弱 NSCLC 细胞的增殖、迁移与侵袭,抑制免疫逃逸。ZHANG 等^[16]研究发现,长链非编码 RNA 01207 通过与 NSCLC 细胞中 *miR*-525-5p 的竞争性结合调节 Rho GTP 酶激活蛋白的表达,影响癌细胞的增殖、迁移与侵袭,发挥致癌作用。TAN 等^[17]研究发现,长链非编码 RNA 小核仁 RNA 宿主基因 12 通过抑制 *miR*-525-5p 和升高 X 连锁凋亡抑制蛋白表达来降低 NSCLC 细胞对顺铂的敏感性,增强 NSCLC 化疗耐药。由此可见 *miR*-525-5p 在调控 NSCLC 中发挥重要作用,上调其表达可能有利于 NSCLC 治疗。既往研究证实,UBE2C 的沉默表达能抑制甲状腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,促进肿瘤细胞的凋亡^[18],刘盈等^[10]和 ZHANG 等^[11]的研究也表明,抑制 UBE2C 可能有利于控制 NSCLC 进展。本研究中,PMS 处理可增加 A549 细胞凋亡水平,减少侵袭数目,说明 PMS 可能通过诱导肺癌细胞凋亡、抑制癌细胞侵袭发挥抗癌作用,而抑制 *miR*-525-5p 表达可部分逆转 PMS 的作用,在此基础上沉默 UBE2C 则可以减弱抑制 *miR*-525-5p 表达的影响,这说明 PMS 通过调控 *miR*-525-5p/UBE2C 轴诱导癌细胞凋亡、抑制癌细胞侵袭,发挥抗癌作用。此外,在小鼠肿瘤模型中也发现 PMS 通过调控 *miR*-525-5p/UBE2C 轴抑制小鼠肿瘤生长,共同验证了 PMS 通过调控 *miR*-525-5p/UBE2C 轴发挥抗癌作用。

本研究提示,PMS 通过调控 *miR*-525-5p/UBE2C 轴诱导癌细胞凋亡、抑制癌细胞侵袭,并抑制小鼠移植瘤生长,发挥抗癌作用,这为临床治疗 NSCLC 提供了新的实验基础。

参考文献:

- [1] 国家卫生健康委办公厅. 原发性肺癌诊疗指南(2022 年版)[J]. 协和医学杂志,2022,13(4):549—570.
- [2] 丁彤晶,念家云,张佳慧,等. 基于数据挖掘的王笑民教授治疗非小细胞肺癌的用药规律[J]. 世界中医药,2023,18(17):2524—2530.
- [3] ZUO X, LI L, SUN L. Plantamajoside inhibits hypoxia-induced migration and invasion of human cervical cancer cells through the NF- κ B and PI3K/Akt pathways[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(4):339—348.
- [4] 崔百强,白向豆,苟云久. 泛素偶联酶 2C 对食管鳞癌 KYSE-30 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(5):659—663.
- [5] 王羽飞. AGGF1 和 UBE2C 在非小细胞肺癌中的表达及其与微血管密度的关系[D]. 安徽 蚌埠:蚌埠医学院,2022.
- [6] 国鲁源,阿不来提·阿合买提,布威阿丽耶·胡加阿布都拉,等. 基于 UHPLC-QE-MS 技术的两色金鸡菊总黄酮干预肺癌移植瘤小鼠瘤组织的代谢组学研究[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(9):1321—1325.
- [7] 乔梁,王斌,王昱杰,等. 微小 RNA-197-3p 对鼻窦黏膜上皮细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2022,38(6):528—531,536.
- [8] 李秀育,马科,闫靖楠,等. 基于网络药理学和体内外实验研究臭壳虫对非小细胞肺癌增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 中国中药杂志,2023,48(13):3576—3588.
- [9] 左伟,贾丽艳,罗栋梁,等. *miR*-525-5p 通过靶向结合围脂滴蛋白 3 调控胶质瘤细胞的迁移、侵袭与增殖[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2023,39(6):821—830.
- [10] 刘盈,黄凤祥,陈红杰,等. 基于数据库挖掘 UBE2C 在肺癌中的表达及其临床意义[J]. 中南大学学报(医学版),2020,45(9):1044—1052.
- [11] ZHANG S, YOU X, ZHENG Y, et al. The UBE2C/CDH1/DEPTOR axis is an oncogene and tumor suppressor cascade in lung cancer cells[J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(4):162434.
- [12] WANG Y, LIU M, CHEN S, et al. Plantamajoside represses the growth and metastasis of malignant melanoma[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3):2296—2302.
- [13] 张博达,谢芳,何亚玲,等. 冬凌草素诱导非小细胞肺癌细胞凋亡的作用及机制研究[J]. 天然产物研究与开发,2024,36(10):1692—1697,1713.
- [14] 丁万盛,鲁文君. 华蟾素对非小细胞肺癌细胞的作用及机制研究[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(22):3259—3263.
- [15] 黄健,石丹丹,杨芳英. PRSS3 通过 FGFR2 激活 JAK2/STAT3 信号通路调节 PD-L1 表达促进非小细胞肺癌免疫逃逸[J]. 免疫学杂志,2024,40(7):575—580.
- [16] ZHANG B, JIN Z, ZHANG H. LINC01207 promotes the progression of non-small cell lung cancer via regulating ARHGAP11A by sponging *miR*-525-5p[J]. *Cancer Biomark*, 2022, 33(3):401—414.
- [17] TAN D, WANG S, ZHANG P, et al. LncRNA SNHG12 decreases non-small cell lung cancer cell sensitivity to cisplatin by repressing *miR*-525-5p and promoting XIAP[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2023, 53(1):64—75.
- [18] YEN M C, WU K L, LIU Y W, et al. Ubiquitin conjugating enzyme E2 H(UBE2H) is linked to poor outcomes and metastasis in lung adenocarcinoma [J]. *Biology(Basel)*, 2021, 10(5):378.

(收稿日期 2024-12-04)