·实验研究·

华蟾酥毒基下调 LINC01116 抑制骨肉瘤 U－2OS 细胞增殖与侵袭的机制*

赵红珂[1]，周岳阳[1]，薛欢歌[1]，马子冬[1]，李缘[1]，张丙霞[1]，康小红[1]，曹飞[1,2]✉

1. 河南医药大学第一附属医院肿瘤科，河南 新乡 453100；2. 平顶山市第一人民医院骨科，河南 平顶山 467000

摘要：目的：探讨华蟾酥毒基调控 LINC01116 表达干预骨肉瘤细胞 U－2OS 增殖与侵袭的作用机制。方法：不同浓度华蟾酥毒基干预 U－2OS 细胞，MTT 法检测细胞活性，计算半数抑制浓度（50% inhibitory concentration，IC_{50}）；Transwell 实验检测细胞侵袭能力；qRT－PCR 检测 LINC01116 表达水平。利用多组学分析平台（ExpOmics）下载儿童骨肉瘤 TARGET－OS 项目的基因表达数据，分析 LINC01116 共表达基因，京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析预测 LINC01116 参与调控的信号通路；基因集富集分析（gene set enrichment analysis，GSEA）评估 LINC01116 高表达样本中信号通路富集情况。Swiss Target Prediction 数据库预测华蟾酥毒基作用靶点，DAVID 数据库进行 KEGG 通路分析。慢病毒载体转染 U－2OS 细胞，分为空载对照组（NC 组）与过表达 LINC01116 组（LINC01116 组），另加入 0、50 nmol·L^{-1} 华蟾酥毒基干预，采用前法检测 LINC01116 表达水平、细胞活性与侵袭能力，Western blot 检测 Yes 关联蛋白（Yes－associated protein，YAP）、p－YAP、富含半胱氨酸蛋白 61（cysteine－rich angiogenic inducer 61，CYR61）和结缔组织生长因子（connective tissue growth factor，CTGF）蛋白表达水平；qRT－PCR 检测 *CYR61* 和 *CTGF* 基因表达水平。结果：华蟾酥毒基呈浓度依赖性抑制 U－2OS 细胞增殖、侵袭及 LINC01116 表达，IC_{50} 为（45.34±7.32）nmol·L^{-1}。GSEA 与网络药理学分析显示，LINC01116 高表达样本与华蟾酥毒基潜在靶点均显著富集于 Hippo/YAP 信号通路。与 NC 组比较，LINC01116 组细胞 LINC01116、*CYR61* mRNA、*CTGF* mRNA 表达水平升高（$P<0.01$），YAP、CYR61、CTGF 蛋白表达水平升高（$P<0.01$），p－YAP 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）。50 nmol·L^{-1} 华蟾酥毒基可显著抑制 NC 组细胞侵袭，下调 YAP、CYR61、CTGF 蛋白表达水平（$P<0.01$），上调 p－YAP 蛋白表达水平（$P<0.01$），下调 *CYR61* mRNA、*CTGF* mRNA 表达水平（$P<0.01$）；而对 LINC01116 组细胞上述 Hippo/YAP 通路相关蛋白及 mRNA 的调控作用明显减弱（$P>0.05$）。结论：华蟾酥毒基可抑制 U－2OS 细胞增殖与侵袭，其机制可能与下调 LINC01116、抑制 Hippo/YAP 信号通路有关。

关键词：骨肉瘤；华蟾酥毒基；LINC01116；U－2OS 细胞；Hippo/YAP 信号通路；细胞增殖；细胞侵袭
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2026.08.264
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2026)08－1758－08

Action Mechanism of Cinobufagin in Downregulating LINC01116 to Inhibit Proliferation and Invasion of Osteosarcoma U－2OS Cells

ZHAO Hongke[1]，ZHOU Yueyang[1]，XUE Huan′ge[1]，MA Zidong[1]，LI Yuan[1]，
ZHANG Bingxia[1]，KANG Xiaohong[1]，CAO Fei[1,2]

1. Department of Oncology，The First Affiliated Hospital to Henan University of Medicine，Xinxiang Henan China 453100；
2. Department of Orthopedics，The First People′s Hospital of Pingdingshan，Pingdingshan Henan China 467000

*基金项目：国家自然科学基金项目（82474325）；河南省医学科技攻关项目（LHGJ20240468，LHGJ20240494，LHGJ20230498）
作者简介：赵红珂（1986－），女，河南郑州人，医学硕士，研究方向：恶性肿瘤精准治疗的基础与临床研究。
✉通信作者：曹飞，医学硕士，主任医师，硕士研究生导师，研究方向：骨恶性肿瘤治疗抵抗基础与临床研究。E－mail：cf771225@163.com

Abstract: Objective: To explore the mechanism by which cinobufagin regulates LINC01116 expression to interfere with the proliferation and invasion of osteosarcoma U－2OS cells. Methods: U－2OS cells were treated with different concentrations of cinobufagin, and cell viability was measured using the MTT assay, calculating the half－maximal inhibitory concentration (IC_{50}); cell invasion was assessed using the Transwell assay; qRT－PCR was used to measure LINC01116 expression levels. Gene expression data from the pediatric osteosarcoma TARGET－OS project were downloaded via the multi－omics analysis platform (ExpOmics) to analyze LINC01116 co－expressed genes. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis was used to predict signaling pathways involved in LINC01116 regulation; gene set enrichment analysis (GSEA) evaluated pathway enrichment in high LINC01116－expressing samples. Cinobufagin target sites were predicted using the Swiss Target Prediction database, and KEGG pathway analysis was performed via the DAVID database. U－2OS cells were transfected with a lentiviral vector, divided into the empty control group (NC group) and LINC01116 overexpression group (LINC01116 group), with additional interventions of 0 and 50 nmol · L^{-1} cinobufagin. LINC01116 expression, cell viability, and invasion were analyzed using the methods described above. Western blot detected protein expression of Yes－associated protein (YAP), p－YAP, cysteine－rich angiogenic inducer 61 (CYR61), and connective tissue growth factor (CTGF); qRT－PCR assessed *CYR61* and *CTGF* gene expression levels. Results: Cinobufagin showed a concentration－dependent inhibition on the proliferation, invasion, and LINC01116 expression of U－2OS cells, with an IC_{50} of (45.34 ± 7.32) nmol · L^{-1}. GSEA and network pharmacology analyses indicated that samples with high LINC01116 expression and potential targets of cinobufagin were significantly enriched in the Hippo/YAP signaling pathway. Compared with the NC group, cells in the LINC01116 group had increased levels of LINC01116, *CYR61* mRNA, and *CTGF* mRNA ($P<0.01$), increased protein levels of YAP, CYR61, and CTGF ($P<0.01$), and decreased p－YAP protein levels ($P<0.01$). Treatment with 50 nmol · L^{-1} cinobufagin significantly inhibited the invasion of NC group cells, downregulated YAP, CYR61, and CTGF protein levels ($P<0.01$), upregulated p－YAP protein levels ($P<0.01$), and reduced *CYR61* and *CTGF* mRNA levels ($P<0.01$); however, these regulatory effects on Hippo/YAP pathway－related proteins and mRNAs were markedly weakened in the LINC01116 cells ($P>0.05$). Conclusion: Cinobufagin can inhibit U－2OS cell proliferation and invasion, possibly through downregulating LINC01116 and blocking the Hippo/YAP signaling pathway.

Key words: osteosarcoma; cinobufagin; LINC01116; U－2OS cells; Hippo/YAP signaling pathway; cell proliferation; cell invasion

骨肉瘤(Osteosarcoma)是好发于儿童与青少年的最常见的原发性骨恶性肿瘤,发病部位主要在四肢干骺端,具有恶性程度高、侵袭性强、易复发和转移率高等特点[1-2]。新辅助化疗联合手术切除显著提高了骨肉瘤患者的 5 年生存率,但复发和转移仍是临床治疗面临的难题[3-6]。研究发现,长链非编码 RNA－01116(LINC01116)在肝癌、肺癌、胶质瘤、乳腺癌等恶性肿瘤发生发展过程中发挥重要作用[7-10]。LINC01116 亦与骨肉瘤增殖、侵袭和转移密切相关,是骨肉瘤治疗的潜在靶点[11-13],但靶向抑制 LINC01116 的药物尚未问世。因此,从中医药中寻找 LINC01116 的抑制剂具有重要的临床应用价值。

华蟾酥毒基是中药蟾酥和干蟾皮的主要活性成分之一,具有显著的抗肿瘤作用[14-15]。本课题组在前期研究中发现,华蟾酥毒基能够抑制骨肉瘤细胞增殖和侵袭、诱导细胞凋亡[16-18],但具体机制尚不明确。因此,本研究观察华蟾酥毒基对 U－2OS 骨肉瘤细胞增殖、侵袭及 LINC01116 表达的影响,应用网络药理学等方法探讨华蟾酥毒基抑制骨肉瘤进展的潜在作用机制。

1　材料

1.1　细胞　人骨肉瘤 U－2OS 细胞株购于美国 ATCC 公司,货号:HTB－96。

1.2　试剂　胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司,货号:A5256901、11965092);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、MTT、PMSF(北京索莱宝科技有限公司,货号:D8371、IM0280、P0100);华蟾酥毒基(MedChemExpress 公司,货号:HY－N0421);Transwell 小室(美国 Corning 公司,货号:CLS3422);Matrigel 基质胶(美国 BD 公司,货号:356234);LV－vector、LV－LINC01116 慢病毒载体(上海吉玛制药技术有限公司);逆转录试剂盒、qRT－PCR 试剂盒(近岸蛋白质科技股份有限公司,货号:E047、E096);RIPA 裂解缓冲液、蛋白磷酸酶抑制剂混合物(苏州新赛美生物科技有限公司,货号:WB3100、P003);BCA 蛋白定量试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司,货号:ZJ102);Yes 关联蛋白(Yes－associated protein, YAP)、p－YAP、富含半胱氨酸蛋白 61(cysteine－rich angiogenic inducer 61, CYR61)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)抗体(Cell

Signaling Technology 公司，货号：14074、4911、14479、86641）。

1.3　仪器　EPOCH2 型酶标仪（美国博腾仪器有限公司）；ECLIPSETS2 型倒置显微镜（日本尼康公司）；N80TOUCH 型超微量分光光度计（德国 IMPLEN 公司）；Fresco21 型高速冷冻离心机（美国赛默飞世尔科技公司）；TY2021003228 型实时荧光定量 PCR 仪（Applied Biosystems 公司）；Amersham Imager 600 型化学发光荧光成像系统（美国 GE 公司）。

2　方法

2.1　细胞培养　人骨肉瘤 U－2OS 细胞采用含 10% FBS、1% 青霉素－链霉素的 DMEM 培养基培养，采用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

2.2　细胞转染　取对数生长期的 U－2OS 细胞，消化后以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板，常规培养过夜后，按照感染复数＝10 加入慢病毒载体 LV－vector、LV－LINC01116 感染细胞，24 h 后更换为正常培养液继续培养。感染 48 h 后采用倒置荧光显微镜观察转染效果，应用 qRT－PCR 检测 LINC01116 表达水平，确定过表达后进行后续实验。应用 puromycin 筛选稳定转染细胞株，分为空载对照组（NC 组）、过表达 LINC01116 组（LINC01116 组）、空载对照＋华蟾酥毒基组（NC－华蟾酥毒基组）、过表达 LINC01116＋华蟾酥毒基组（LINC01116－华蟾酥毒基组）。

2.3　qRT－PCR 检测 LINC01116、*CYR61* 和 *CTGF* mRNA 表达　应用 Trizol 提取细胞总 RNA，采用逆转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA，反应条件为：50 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s。应用 qRT－PCR 试剂盒进行 PCR，两步法扩增程序为：95 ℃ 1 min，95 ℃ 20 s、60 ℃ 1 min，循环 35～45 次，具体操作按照试剂盒说明书进行，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，序列见表 1。

2.4　MTT 法检测细胞活性　取对数生长期的 U－2OS 细胞，接种于 96 孔板，置于培养箱常规培养，24 h 后应用不同浓度华蟾酥毒基（0、12.5、25、50、100、200 nmol·L^{-1}）干预 48 h，每个浓度设 5 个复孔。处理结束后每孔加入 20 μL MTT 溶液（5 g·L^{-1}）继续培养 4 h，弃去上清液，每孔加入 150 μL DMSO，振荡后于 490 nm 处测定每孔的吸光度值（A），计算细胞存活率和半数抑制浓度（50% inhibitory concentration，IC_{50}），实验重复 3 次。

表 1　引物序列

引物名称	引物序列
LINC01116	F（5′－3′）GCCCTGAAGTACACAGTTTTCTTGG
	R（3′－5′）AGTGCTTTGCCATTCTGATGTTACC
CTGF	F（5′－3′）TCAAGCTGCCCGGGAAATGC
	R（3′－5′）TGTTGGAACAGGCGCTCCACTCTG
CYR61	F（5′－3′）GGTCAAAGTTACCGGGCAGT
	R（3′－5′）GGAGGCATCGAATCCCAGC
GAPDH	F（5′－3′）TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG
	R（3′－5′）TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT

2.5　Transwell 法检测细胞侵袭能力　采用 24 孔板的 Transwell 小室进行细胞侵袭实验，在上室膜表面均匀铺被 Matrigel 胶。U－2OS 细胞常规消化后应用含华蟾酥毒基（0、25、50 nmol·L^{-1}）的无血清 DMEM 培养液重悬细胞，调整细胞浓度为 1×10^5 mL^{-1}。取 200 μL 细胞悬液加入上室，下室加入 600 μL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h，取出小室，加入多聚甲醛固定细胞 30 s。加入结晶紫染液室温染色 20 min，自然干燥后于倒置显微镜下观察并计数细胞侵袭数量，实验重复 3 次。

2.6　骨肉瘤数据库及在线分析　应用多组学分析平台（ExpOmics，http://www.biomedical－web.com/expomics）检索并下载儿童骨肉瘤 TARGET－OS（Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments－Osteosarcoma）项目的临床信息和基因表达数据，在线分析骨肉瘤患者中 LINC01116 的共表达基因，筛选条件为相关系数的绝对值≥0.5，且 $P<0.05$。对筛选出的共表达基因进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路富集分析，以预测 LINC01116 可能参与调控的信号通路。依据 LINC01116 表达的中位值，将儿童骨肉瘤的基因表达数据划分为高、低表达组，采用基因集富集分析（gene set enrichment analysis，GSEA）对两组样本的基因表达谱进行系统比较，以评估其在预设基因集上的富集情况。

2.7　华蟾酥毒基药物靶点获取与通路分析　通过 PubChem 数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov）查找华蟾酥毒基的 SMILES 号，并下载其 3D 结构。采用 Swiss Target Prediction（http://swisstargetprediction.ch）数据库预测华蟾酥毒基的作用靶点。应用 DAVID 数据库对华蟾酥毒基作用靶点进行

KEGG 通路分析，以校正后的 $P<0.05$ 为条件筛选分析结果。

2.8　Western blot 法检测蛋白表达　U－2OS 细胞接种于 6 孔板，应用 50 nmol·L^{-1}华蟾酥毒基干预 48 h，预冷 PBS 冲洗 3 次，RIPA 裂解缓冲液（含 PMSF、蛋白磷酸酶抑制剂混合物）提取细胞总蛋白，应用 BCA 分析试剂盒测定蛋白浓度。取 20 μg 蛋白质采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，湿法转移至聚偏二氟乙烯膜上，5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h，5% 牛血清白蛋白稀释一抗（1∶1 000），一抗 4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜 3 次；加入 5% 牛血清白蛋白稀释二抗（1∶50 000）室温孵育 2 h，TBST 洗膜 3 次；加入 ECL 发光液显影，以 GAPDH 为内参蛋白，实验重复 3 次。

2.9　统计学方法　采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。若数据符合正态分布，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐者两两比较采用 *LSD* 检验，方差不齐者采用 *Tamhane's T2* 检验；若数据不服从正态分布，采用非参数秩和检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　华蟾酥毒基对 U－2OS 细胞活性的影响　MTT 结果显示，不同浓度华蟾酥毒基处理 U－2OS 细胞 48 h，均可抑制细胞活性，且随着浓度增加其抑制作用不断增强，IC_{50}为（45.34 ± 7.32）nmol·L^{-1}，见图 1。

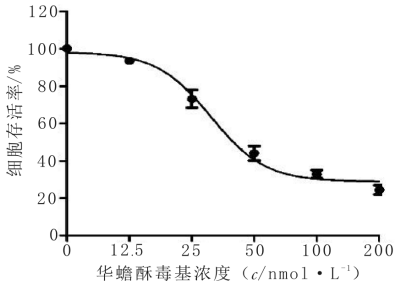
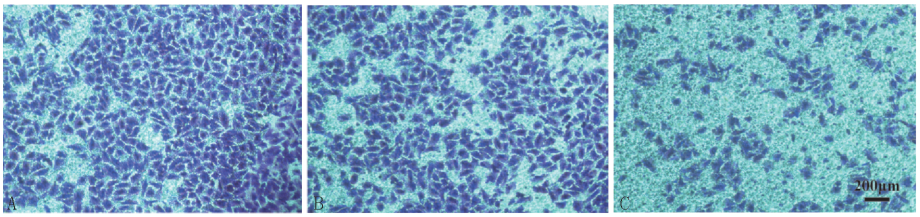


图 1　不同浓度华蟾酥毒基处理 U－2OS 细胞存活率曲线图

3.2　华蟾酥毒基对 U－2OS 细胞侵袭能力的影响　Transwell 实验结果显示，不同浓度华蟾酥毒基作用于 U－2OS 细胞 24 h 后，细胞侵袭数量减少；50 nmol·L^{-1} 华蟾酥毒基可显著抑制细胞侵袭，差异具有统计学意义（$P<0.01$），见图 2、表 2。



注：A：0 nmol·L^{-1}华蟾酥毒基组；B：25 nmol·L^{-1}华蟾酥毒基组；C：50 nmol·L^{-1}华蟾酥毒基组。

图 2　不同浓度华蟾酥毒基素处理 U－2OS 细胞侵袭染色图

表 2　不同浓度华蟾酥毒基素处理 U－2OS 细胞侵袭数量比较　（$\bar{x}\pm s$，个）

组别	n	细胞侵袭数量
0 nmol·L^{-1}华蟾酥毒基组	3	1 095.67 ± 37.52
25 nmol·L^{-1}华蟾酥毒基组	3	977.00 ± 16.52
50 nmol·L^{-1}华蟾酥毒基组	3	605.67 ± 39.64**

注：与 0 nmol·L^{-1}华蟾酥毒基组比较，**$P<0.01$。

3.3　华蟾酥毒基对 U－2OS 细胞 LINC01116 表达的影响　qRT－PCR 结果显示，不同浓度华蟾酥毒基均可下调 U－2OS 细胞 LINC01116 表达水平，且呈浓度依赖性；25、50 nmol·L^{-1}华蟾酥毒基可显著抑制 U－2OS 细胞 LINC01116 表达（$P<0.05$），见表 3。

3.4　过表达 LINC01116 后华蟾酥毒基对 U－2OS 细胞增殖和侵袭的影响　慢病毒感染 U－2OS 细胞后（图 3），qRT－PCR 检测慢病毒感染效率，结果显示，与 NC 组比较，LINC01116 组细胞 LINC01116 表达水平显著升高（表 4），提示 LINC01116 过表达细胞模型构建成功。

表 3　不同浓度华蟾酥毒基素处理 U－2OS 细胞 LINC01116 表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	LINC01116
DMSO 组	3	1.00 ± 0.06
12.5 nmol·L^{-1}华蟾酥毒基组	3	0.78 ± 0.03
25 nmol·L^{-1}华蟾酥毒基组	3	0.55 ± 0.02*
50 nmol·L^{-1}华蟾酥毒基组	3	0.30 ± 0.10**

注：与 DMSO 组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$。

表 4　慢病毒感染 U－2OS 细胞后 LINC01116 表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	LINC01116
NC 组	3	1.00 ± 0.06
LINC01116 组	3	6.34 ± 0.72**

注：与 NC 组比较，**$P<0.01$。

MTT、Transwell 检测结果显示，华蟾酥毒基可显著抑制 NC 组细胞增殖和侵袭，但对 LINC01116 组细胞增殖和侵袭的抑制作用明显减弱，见图 4。与 NC 组比较，NC－华蟾酥毒基组细胞侵袭数量减少（$P<0.01$）；与 NC－华蟾酥毒基组比较，LINC01116－华蟾酥毒基组细胞侵袭数量增加（$P<0.01$）；与 LINC01116 组比较，LINC01116－华蟾酥毒基组细胞侵袭数量减少（$P<0.01$），见表 5，提示华蟾酥毒基抑制 U－2OS 细胞增殖和侵袭的机制与下调 LINC01116 有关。

表 5　各组 U－2OS 细胞侵袭数量比较　（$\bar{x}\pm s$，个）

组别	n	细胞侵袭数量
NC 组	3	766.00±46.04
NC－华蟾酥毒基组	3	264.33±25.66**
LINC01116 组	3	836.00±63.56
LINC01116－华蟾酥毒基组	3	679.00±30.41##^^

注：与 NC 组比较，**$P<0.01$；与 NC－华蟾酥毒基组比较，##$P<0.01$；与 LINC01116 组比较，^^$P<0.01$。

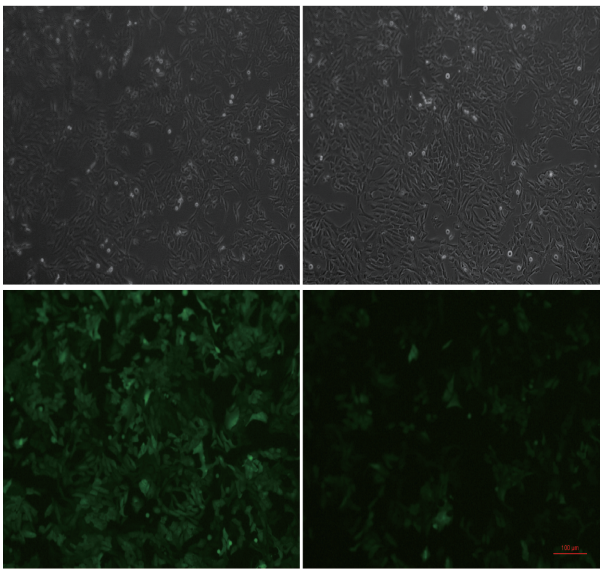
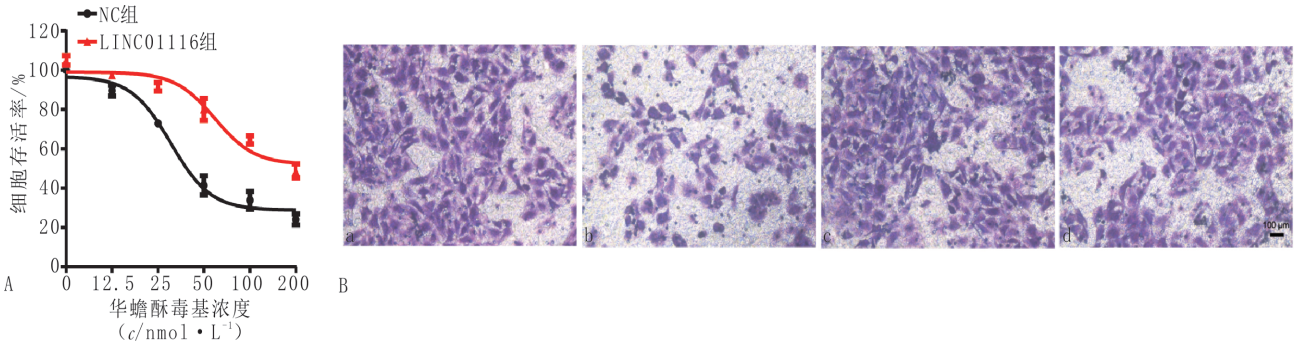


图 3　慢病毒感染 U－2OS 细胞构建过表达 LINC01116 细胞株免疫荧光染色图



注：A：不同浓度华蟾酥毒基作用于 U－2OS 细胞存活率曲线图；B：华蟾酥毒基作用于 U－2OS 细胞侵袭染色图，a：NC 组，b：NC－华蟾酥毒基组，c：LINC01116 组，d：LINC01116－华蟾酥毒基组。

图 4　过表达 LINC01116 后华蟾酥毒基对 U－2OS 细胞增殖和侵袭的影响

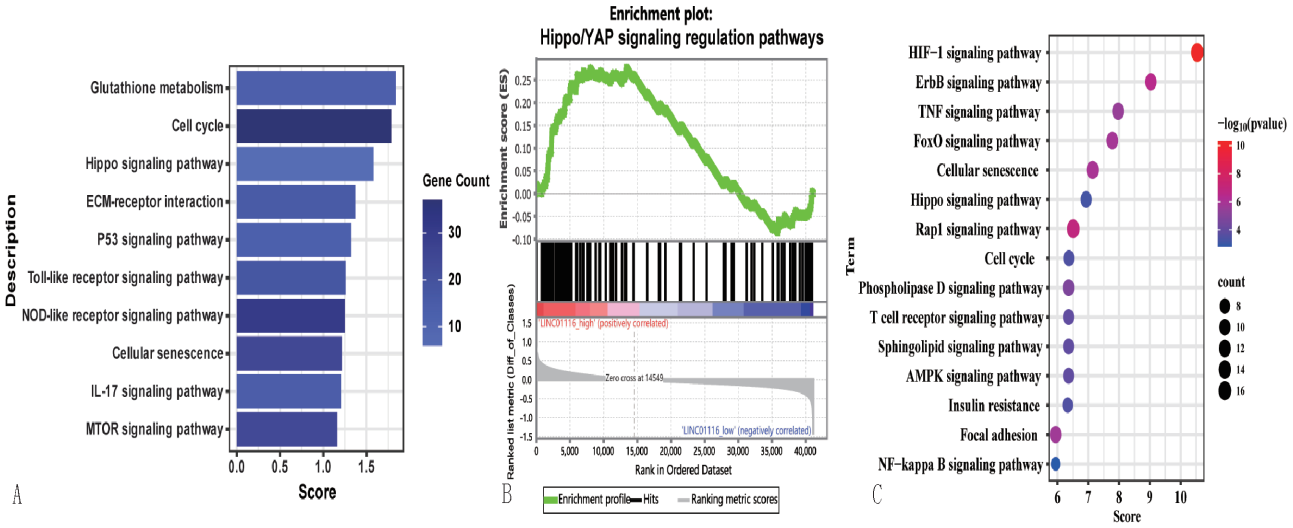
3.5　LINC01116 及华蟾酥毒基调控骨肉瘤信号通路分析　对 LINC01116 的共表达基因进行 KEGG 分析显示，其主要参与谷胱甘肽代谢、细胞周期、Hippo 信号通路、ECM－受体相互作用以及 P53 信号通路等多个关键生物过程，见图 5A。GSEA 结果显示，LINC01116 高表达样本的基因表达谱在 Hippo/YAP 信号通路相关基因集中呈现显著富集，见图 5B，提示 LINC01116 高表达可能与 Hippo/YAP 信号通路的激活存在功能联系。通过 Swiss Target Prediction 数据库共获得华蟾酥毒基 100 个潜在作用靶点，KEGG 分析显示华蟾酥毒基相关靶点主要富集于 HIF－1 信号通路、TNF 信号通路及 Hippo 信号通路等，见图 5C。其中，Hippo/YAP 通路同时在 LINC01116 高表达样本与华蟾酥毒基作用靶点涉及的通路中显著富集。

3.6　LINC01116 对 Hippo/YAP 信号通路的影响　Western blot 结果显示，与 NC 组比较，LINC01116 组细胞 YAP、CYR61、CTGF 蛋白表达水平显著升高，p－YAP 蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$），见图 6、表 6。qRT－PCR 结果显示，与 NC 组比较，LINC01116 组细胞 *CYR61*、*CTGF* mRNA 表达水平显著升高（$P<0.01$），见表 7。

表 6　过表达 LINC01116 后细胞 YAP、p－YAP、CYR61、CTGF 蛋白表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	YAP	p－YAP	CYR61	CTGF
NC 组	3	0.87±0.03	1.01±0.05	0.37±0.02	0.47±0.03
LINC01116 组	3	1.20±0.05**	0.55±0.02**	1.22±0.06**	1.32±0.03**

注：与 NC 组比较，**$P<0.01$。



注：A：LINC01116 共表达基因的 KEGG 通路富集分析；B：LINC01116 高表达样本中 Hippo/YAP 信号通路相关基因集的 GSEA 富集分析；C：网络药理学分析华蟾酥毒基作用靶点富集的信号通路。

图 5　LINC01116 及华蟾酥毒基调控骨肉瘤的潜在信号通路

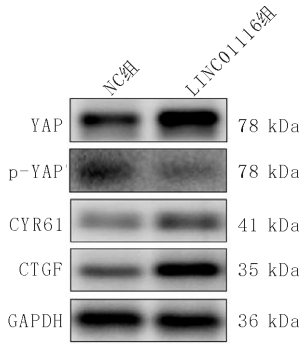


图 6　过表达 LINC01116 后细胞 YAP、p－YAP、CYR61、CTGF 蛋白条带图

表 7　过表达 LINC01116 后细胞 *CYR61*、*CTGF* mRNA 表达水平比较　$(\bar{x} \pm s)$

组别	n	*CYR61* mRNA	*CTGF* mRNA
NC 组	3	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.08
LINC01116 组	3	3.12 ± 0.26**	2.80 ± 0.10**

注：与 NC 组比较，** $P < 0.01$。

3.7　华蟾酥毒基对 Hippo/YAP 信号通路的影响

华蟾酥毒基可显著下调 NC 组细胞 YAP 蛋白表达，上调 p－YAP 蛋白表达；但过表达 LINC01116 后，华蟾酥毒基对 YAP、p－YAP 的调控作用减弱。Western blot 结果显示，与 NC 组比较，NC－华蟾酥毒基组细胞 YAP、CYR61、CTGF 蛋白表达水平显著降低，p－YAP 蛋白表达水平显著升高（$P < 0.01$），见图 7、表 8。qRT－PCR 结果显示，与 NC 组比较，NC－华蟾酥毒基组细胞 *CYR61*、*CTGF* mRNA 表达水平显著降低（$P < 0.01$），见表 9。

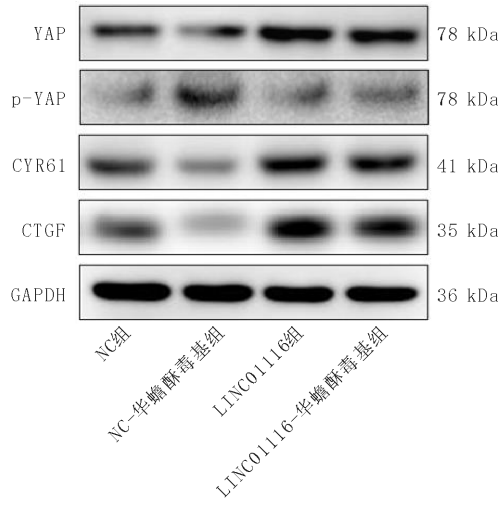


图 7　各组 U－2OS 细胞 YAP、p－YAP、CYR61、CTGF 蛋白条带图

表 8　各组 U－2OS 细胞 YAP、p－YAP、CYR61、CTGF 蛋白表达水平比较　$(\bar{x} \pm s)$

组别	n	YAP	p－YAP	CYR61	CTGF
NC 组	3	0.32 ± 0.02	0.45 ± 0.03	0.55 ± 0.07	0.37 ± 0.02
NC－华蟾酥毒基组	3	0.25 ± 0.02**	0.99 ± 0.07**	0.32 ± 0.02**	0.22 ± 0.02**
LINC01116 组	3	0.62 ± 0.04	0.70 ± 0.05	1.77 ± 0.05	1.00 ± 0.07
LINC01116－华蟾酥毒基组	3	0.58 ± 0.04	0.78 ± 0.09	1.66 ± 0.06	0.88 ± 0.03

注：与 NC 组比较，** $P < 0.01$。

表 9　各组 U－2OS 细胞 *CYR61*、*CTGF* mRNA 表达水平比较　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	*CYR61* mRNA	*CTGF* mRNA
NC 组	3	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.18
NC－华蟾酥毒基组	3	0.49 ± 0.02**	0.47 ± 0.00**
LINC01116 组	3	3.04 ± 0.22	2.52 ± 0.26
LINC01116－华蟾酥毒基组	3	2.40 ± 0.13	2.26 ± 0.08

注：与 NC 组比较，** $P < 0.01$。

4　讨论

长链非编码 RNA（long noncoding RNA，lncRNA）是一类长度大于 200 nt、不具备蛋白编码潜能的 RNA，可参与细胞增殖[19]、凋亡[20]、侵袭[21]等多种生物学过程，在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用[22－23]。LINC01116 定位于人类染色体 2q14.1，其异常表达与多种恶性肿瘤发生发展相关。LINC01116 通过吸附 microRNA（如 miR－31－5p 等）上调血管内皮生长因子等基因表达，促进胶质瘤增殖、侵袭及转移[9]；通过将促进转录因子与核糖体 DNA 启动子结合来增强 Pol I 转录，从而驱动肺腺癌的致癌活性[8]；通过阻止 E3 泛素蛋白连接酶 RAD18 对尤文肉瘤断裂区域 1 的泛素化降解促进肝癌免疫逃逸[7]。此外，LINC01116 通过结合 EZH2 调控 PTEN 和 p53 的表达参与骨肉瘤的发生发展；通过吸附 miR－424－5p 上调高迁移率族 AT－hook 蛋白 2 表达促进骨肉瘤对多柔比星耐药[11－12]。可见，抑制 LINC01116 表达可能阻止骨肉瘤生长、转移和化疗抵抗，有望成为诊疗骨肉瘤的新策略。

华蟾酥毒基属蟾蜍二烯羟酸内酯类化合物，具有明确的抗肿瘤活性[14,24－25]。课题组前期研究发现，华蟾酥毒基可有效抑制骨肉瘤细胞的增殖和转移[16－17]，但其潜在分子机制尚未完全阐明，尤其是与 lncRNA 异常表达调控的相关性仍不明确。在此基础上，本研究进一步证实华蟾酥毒基可显著抑制骨肉瘤 U－2OS 细胞的增殖与侵袭能力，并发现其可下调 LINC01116 的表达水平。通过 LINC01116 过表达回补实验发现，LINC01116 过表达可部分逆转华蟾酥毒基对骨肉瘤细胞增殖和侵袭的抑制作用，提示华蟾酥毒基可能通过调控 LINC01116 介导其对骨肉瘤增殖和转移的抑制作用。

为探讨华蟾酥毒基抑制骨肉瘤增殖和侵袭的作用机制，采用 KEGG、GSEA 分析 LINC01116 调控骨肉瘤的信号通路；应用网络药理学分析华蟾酥毒基潜在靶点富集的信号通路。结果显示，高表达 LINC01116 的骨肉瘤组织中细胞周期、Hippo/YAP 等通路活化。华蟾酥毒基作用靶点显著富集在 HIF－1 信号通路、TNF 及 Hippo 等通路。其中，Hippo/YAP 通路在高表达 LINC01116 的骨肉瘤组织显著富集，同时也是华蟾酥毒基靶基因富集的通路，提示华蟾酥毒基可能通过下调 LINC01116，抑制 Hippo/YAP 信号通路，从而阻止骨肉瘤进展。研究证实，Hippo 通路的主要效应分子 YAP 在通路激活状态下可进入细胞核，与转录共激活因子 TEAD 结合后诱导下游 CYR61、CTGF 等靶基因转录，从而促进骨肉瘤增殖和转移[26]。本研究发现，过表达 LINC01116 后，YAP 蛋白表达水平显著上调，同时其下游靶基因 *CYR61*、*CTGF* mRNA 与蛋白表达水平均显著上调，提示 LINC01116 通过促进 Hippo/YAP 通路活化引起骨肉瘤增殖和转移。此外，华蟾酥毒基可下调 YAP 蛋白表达水平及下游 *CYR61*、*CTGF* mRNA 与蛋白表达水平；过表达 LINC01116 后，华蟾酥毒基抑制 Hippo/YAP 通路的作用被部分逆转，证实华蟾酥毒基通过下调 LINC01116－Hippo/YAP 信号轴从而抑制骨肉瘤增殖和转移。

综上所述，华蟾酥毒基可抑制 U－2OS 细胞增殖与侵袭，其机制可能与下调 LINC01116、抑制 Hippo/YAP 信号通路有关。本研究仍存在一定的局限性，华蟾酥毒基下调 LINC01116 的具体分子机制（如通过转录因子抑制其启动子活性或影响 RNA 稳定性）尚需进一步探索；在其他骨肉瘤细胞中的普适性仍需进一步验证。未来在多种骨肉瘤模型中开展系统验证，将有助于提升研究结论的可靠性和临床转化潜力。

参考文献：

[1] Meltzer P S, Helman L J. New horizons in the treatment of osteosarcoma[J]. N Engl J Med, 2021, 385(22): 2066－2076.

[2] 梁玉婷，韦素萍，王禹，等. 基于 ClinicalTrials.gov 数据库分析骨肉瘤临床试验注册现状[J]. 中国癌症防治杂志，2023，15(1)：75－80.

[3] Yu S N, Yao X D. Advances on immunotherapy for osteosarcoma[J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 192.

[4] Zhou Y, Yang D, Yang Q C, et al. Single－cell RNA landscape of intratumoral heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in advanced osteosarcoma[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 6322.

[5] Shoaib Z, Fan T M, Irudayaraj J M K. Osteosarcoma mecha-

nobiology and therapeutic targets[J]. Br J Pharmacol,2022,179(2):201 - 217.
[6]Celik B,Cicek K,Leal A F,et al. Regulation of molecular targets in osteosarcoma treatment[J]. Int J Mol Sci,2022,23(20):12583.
[7]Ma K,Chu J H,Liu Y F,et al. Hepatocellular carcinoma LINC01116 outcompetes T cells for linoleic acid and accelerates tumor progression[J]. Adv Sci (Weinh),2024,11(21):e2400676.
[8]Sarkar S S,Sharma M,Saproo S,et al. LINC01116 - dependent upregulation of RNA polymerase I transcription drives oncogenic phenotypes in lung adenocarcinoma[J]. J Transl Med,2024,22(1):904.
[9]Ye J L,Zhu J L,Chen H R,et al. A novel lncRNA - LINC01116 regulates tumorigenesis of glioma by targeting VEGFA[J]. Int J Cancer,2020,146(1):248 - 261.
[10]Ren L L,Fang Z R,Xu J J,et al. Matrine inhibits breast cancer cell proliferation and epithelial - mesenchymal transition through regulating the LINC01116/miR - 9 - 5p/ITGB1 axis[J]. Balkan Med J,2025,42(1):54 - 65.
[11]Li R,Ruan Q,Zheng J,et al. LINC01116 promotes doxorubicin resistance in osteosarcoma by epigenetically silencing miR - 424 - 5p and inducing epithelial - mesenchymal transition[J]. Front Pharmacol,2021,12:632206.
[12]Zhang Z F,Xu H H,Hu W H,et al. LINC01116 promotes proliferation,invasion and migration of osteosarcoma cells by silencing p53 and EZH2[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(16):6813 - 6823.
[13]郝洋,章菲凡,杨宁,等. 基于 TrkA/STAT3 信号通路探讨白藜芦醇调控骨肉瘤细胞增殖、凋亡及迁移的机制[J]. 中医学报,2025,40(11):2426 - 2436.
[14]孙博,李明利,丁耀华,等. 基于代谢组学和抗肿瘤活性的 2 种源自不同中华大蟾蜍亚种蟾酥的系统比较研究[J]. 中国中药杂志,2023,48(5):1280 - 1288.
[15]喻昌燕,孟令杰,姜念,等. 蟾皮化学成分和药理活性的研究进展[J]. 中草药,2021(4):1206 - 1220.
[16]王颖,唐晓男,康小红,等. 华蟾酥毒基抑制人骨肉瘤细胞迁移和侵袭的机制研究[J]. 上海中医药杂志,2021,55(12):88 - 93.
[17]柳洋. 华蟾酥毒基对骨肉瘤增殖、转移的作用及其机制研究[D]. 新乡:新乡医学院,2024.
[18]Meng J J,Zhang X Q,Xiang D F,et al. Explore the potential mechanism of Huachansu injection against osteosarcoma via metabolomics,network pharmacology and bioinformatics[J]. Chin Med,2025,20(1):120.
[19]Yu Z L,Lin X H,Zhao P F,et al. YY1 induced FOXD2 - AS1 drives proliferation of oral squamous cell carcinoma through EZH2/CDKN1A axis[J]. Oral Dis,2026,32(3):745 - 759.
[20]Ge W K,Wang Q,Wang H S,et al. M6A - ALKBH5 - dependent RBMS3 - AS3 down - regulation suppresses ferroptosis to promote lung adenocarcinoma progression through HNRNPDL/ZEB1/GPX4 axis[J]. NPJ Precis Oncol,2025,9(1):356.
[21]Lin X K,Hong Y T,You S J,et al. METTL3 - mediated m6A modification of LINC00857 enhances stemness and metastasis of ovarian cancer cells by activating the YAP - TEAD pathway[J]. Sci Rep,2025,15(1):41132.
[22]Nojima T,Proudfoot N J. Mechanisms of lncRNA biogenesis as revealed by nascent transcriptomics[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2022,23(6):389 - 406.
[23]Wang R H,Luo M,Liu Y,et al. Functional,pharmacogenomic,and immune landscapes of long non - coding RNAs in cancer[J]. Adv Sci (Weinh),2026,13(6):e13414.
[24]Liu J W,Jiang J,Huang J,et al. Bufalin inhibits hepatocellular carcinoma progression by blocking EGFR - mediated RAS - RAF - MEK - ERK pathway activation[J]. J Exp Clin Cancer Res,2025,44(1):260.
[25]Yin Z,Li G C,Zhong Q,et al. Cinobufagin overcomes bortezomib resistance in multiple myeloma strains by targeting SEC62/TRPM4 - mediated NECSO[J]. Phytomedicine,2025,147:157171.
[26]Franklin J M,Wu Z M,Guan K L. Insights into recent findings and clinical application of YAP and TAZ in cancer[J]. Nat Rev Cancer,2023,23(8):512 - 525.

收稿日期:2026 - 02 - 18
编辑:刘凯歌