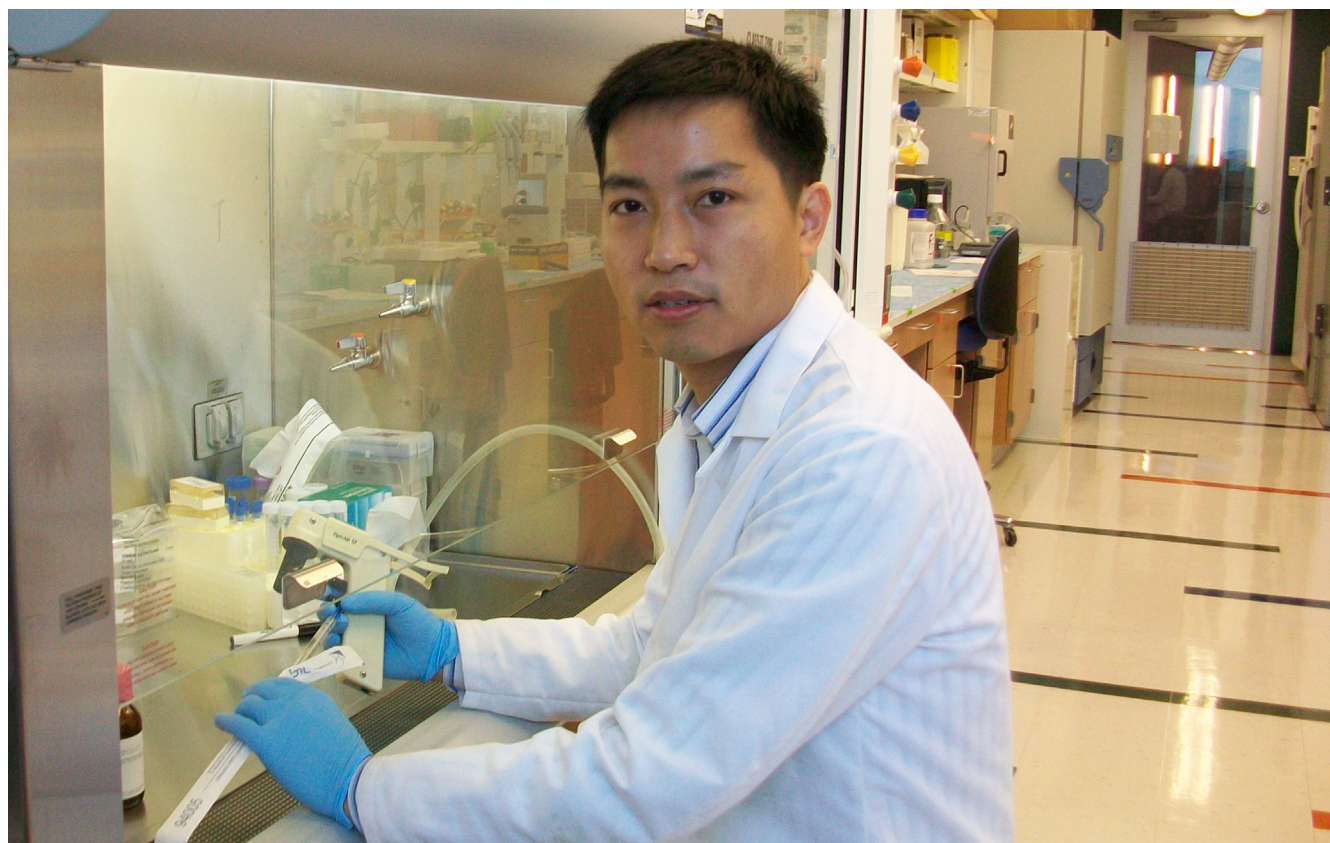


世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2019 年 12 月 28 日 第 27 卷 第 24 期 (Volume 27 Number 24)



24/2019

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被国际检索系统《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》、Scopus、中国知网《中国期刊全文数据库(CNKI)》、《中文科技期刊数据库(CSTJ)》和《超星期刊域出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录.



目次

2019年12月28日 第27卷 第24期 (总第644期)

述评

1465 肠道病毒71型感染手足口病发病机制的研究

王春荣

基础研究

1473 麦冬皂苷D通过调控miR-519d-3p/EIF4E表达对肝癌细胞增殖、迁移、侵袭的实验研究

申鹏, 汪正飞

临床研究

1483 GPX3在胃癌中的表达及临床意义

张海平, 李蜀豫

1490 CCNA2基因在肝细胞癌中的表达、信号通路和预后关系生物信息分析及验证

杨结, 刘树业, 刘运德

文献综述

1502 肝硬化患者自发性脾肾分流的研究进展

易芳芳, 白朝辉, 许向波, 祁兴顺

临床实践

1509 声触诊组织量化技术评估经颈静脉肝内门-腔分流术后疗效的应用价值

张丹, 王一鸣, 李浩

会议纪要

1513 第二届胶囊内镜全球高峰论坛纪要

江学良, 王金山, 何健华

消 息

- 1472 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
1489 《世界华人消化杂志》栏目设置
1501 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费
1508 《世界华人消化杂志》正文要求

封面故事

王来友, 2006年于中山大学临床药理所毕业, 获医学博士学位. 2016年获药理学专业教授资格. 现为广东药科大学硕士研究生导师. 曾分别先后在法国弗朗什-孔泰大学、美国堪萨斯大学医学中心和澳大利亚格里菲斯大学从事研究工作, 目前主要研究方向为基于临床真实世界的循证药学与临床毒理学研究及新药研发. 兼任中国药学会循证药学专业委员会委员、农工党广东省十三届医药卫生工作委员会委员等职. 并在*Drug metabolism and Disposition*、*Pharmacogenomics*、*Marine Drugs*、*RSC advances*、*Nature Medicine*等国内外主流药学类专业期刊发表学术论文60余篇; 获新药发现与创制相关授权专利三项; 作为参与者获广东省科学技术奖一等奖两项; 承担药学人才培养教学改革类项目2项; 发表药学教育类研究论文3篇; 作为特聘编委, 参与高等教育出版社《循证药学》以及《药物毒理学》、《药理学》等教材的编写.

本期责任人

编务 王栋梅; 送审编辑 王禹乔; 组版编辑 刘继红; 英文编辑 王天奇; 形式规范审核编辑部主任 吴云晓健; 最终清样审核总编辑 马连生

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(半月刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2019-12-28

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

主编

程英升, 教授, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科

党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科

吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科

王俊平, 教授, 030001, 山西省太原市, 山西省人民医院消化科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

编辑委员会

编辑委员会成员在线名单, 详见:

<https://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm>

编辑部

马亚娟, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

Baishideng Publishing Group Inc
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: wjgd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Inc
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

制作

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室

电话: 010-85381892

传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被国际检索系统《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》、Scopus、中国知网《中国期刊全文数据库(CNKI)》、《中文科技期刊数据库(CSTJ)》和《超星期刊域出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录.

《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<https://www.baishideng.com>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者和编者之间的信息反馈交流.

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

定价

每期136.00元 全年24期3264.00元

© 2019 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Contents

Volume 27 Number 24 Dec 28, 2019

EDITORIAL

1465 Pathogenesis of hand-foot-mouth disease caused by enterovirus 71

Wang CR

BASIC RESEARCH

1473 Ophiopogonin D inhibits proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells by regulating miR-519d-3p/EIF4E expression

Shen P, Wang ZF

CLINICAL RESEARCH

1483 Clinical significance of expression of glutathione peroxidase 3 in gastric cancer

Zhang HP, Li SY

1490 Integrated bioinformatics analysis of expression, related signaling pathways, and prognostic significance of CCNA2 in hepatocellular carcinoma

Yang J, Liu SY, Liu YD

REVIEW

1502 Advances in research of spontaneous splenorenal shunt in patients with liver cirrhosis

Yi FF, Bai ZH, Xu XB, Qi XS

CLINICAL PRACTICE

1509 Value of virtual touch tissue quantification in evaluating therapeutic effects of transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt

Zhang D, Wang YM, Li H

CONFERENCE SUMMARY

1513 Summary of the Second Capsule Endoscopy Global Summit

Jiang XL, Wang JS, He JH

Contents

World Chinese Journal of Digestology
Volume 27 Number 24 Dec 28, 2019

COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Wang Lai-You, Professor, Department of Clinical Pharmacy and Pharmacy Administration, School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Indexed/Abstracted by

Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, Abstract Journals, Scopus, CNKI, CSTJ and Superstar Journals Database.

RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Dong-Mei Wang* Review Editor: *Yu-Qiao Wang* Electronic Editor: *Ji-Hong Liu*
English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Proof Editor: *Yun-Xiaojuan Wu* Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date December 28, 2019

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

EDITOR-IN-CHIEF

Ying-Sheng Cheng, Professor, Department of Radiology, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Shuang-Suo Dang, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Xue-Liang Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

Lian-Xin Liu, Professor, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Bin Lv, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Jun-Ping Wang, Professor, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Shanxi, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Xiao-Zhong Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Deng-Fu Yao, Professor, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zong-Ming Zhang, Professor, Department of General Surgery, Beijing Electric Power Hospital, Capital Medical University, Beijing 100073, China

EDITORIAL BOARD MEMBERS

All editorial board members resources online at <https://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm>

EDITORIAL OFFICE

Ya-Juan Ma, Director

World Chinese Journal of Digestology

Baishideng Publishing Group Inc
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: wjcd@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

PRODUCTION CENTER

Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China
Telephone: +86-10-85381892
Fax: +86-10-85381893

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 136 Yuan for each issue
RMB 3264 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2019 Baishideng Publishing Group Inc. Articles published by this open access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in journals owned by the Baishideng Publishing Group (BPG) represent the views and opinions of their authors, but not the views, opinions or policies of the BPG, except where otherwise explicitly indicated.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at <https://www.wjgnet.com/1009-3079/Nav/36>. If you do not have web access, please contact the editorial office.

麦冬皂苷D通过调控miR-519d-3p/EIF4E表达对肝癌细胞增殖、迁移、侵袭的实验研究

申鹏, 汪正飞

申鹏, 汪正飞, 衢州市人民医院肝胆外科 浙江省衢州市 324000

申鹏, 主治医师, 主要研究方向为肝胆胰疾病的诊治。

作者贡献分布: 此课题由申鹏设计; 研究过程由申鹏与汪正飞操作完成; 数据分析由申鹏与汪正飞完成; 本论文写作由申鹏与汪正飞完成。

通讯作者: 汪正飞, 副主任医师, 324000, 浙江省衢州市柯城区钟楼底2号, 衢州市人民医院肝胆外科. pазze3@163.com

收稿日期: 2019-11-13

修回日期: 2019-12-10

接受日期: 2019-12-20

在线出版日期: 2019-12-28

Ophiopogonin D inhibits proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells by regulating miR-519d-3p/EIF4E expression

Peng Shen, Zheng-Fei Wang

Peng Shen, Zheng-Fei Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Quzhou City People's Hospital, Quzhou 324000, Zhejiang Province, China

Corresponding author: Zheng-Fei Wang, Deputy Chief Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, Quzhou City People's Hospital, No. 2, Zhongludi, Kecheng District, Quzhou 324000, Zhejiang Province, China. pазze3@163.com

Received: 2019-11-13

Revised: 2019-12-10

Accepted: 2019-12-20

Published online: 2019-12-28

Abstract

BACKGROUND

Ophiopogonin D (OPD) is an important monomer

component in Chinese traditional medicine. Ophiopogon extract has anti-cancer effects, but it is unknown whether it has anti-liver cancer effects. We hypothesized that OPD could have anti-liver cancer activity by up-regulating the expression of miR-519d-3p and then down-regulating the expression of eukaryotic translation initiation factor 4E (EIF4E).

AIM

To investigate the effects of OPD on proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells and the possible mechanism involved.

METHODS

HepG2 and MHCC97 cells were cultured for 48 h after treatment with different concentrations (2.5, 5, and 10 $\mu\text{mol/L}$) of OPD. Methylthiazolotetrazolium (MTT) assay was used to detect cell proliferation, Transwell assay was used to detect cell migration and invasion, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the levels of miR-519d-3p and EIF4E mRNA in HepG2 cells, and Western blot was used to detect the expression levels of CyclinD1, p21, matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and EIF4E proteins. Dual luciferase reporter gene assay was used to validate the relationship between miR-519d-3p and EIF4E. To obtain HepG2 or MHCC97 cells with miR-519d-3p overexpression or EIF4E knockdown, miR-519d-3p mimic or si-EIF4E was transfected into HepG2 or MHCC97 cells. Then, RT-qPCR was used to detect the level of miR-519d-3p expression in HepG2 or MHCC97 cells and Western blot was performed to detect the level of EIF4E protein to verify the transfection efficiency. MTT assay, Transwell assay, and Western blot were used to detect the effects of overexpression of miR-519d-3p or inhibition of EIF4E on cell proliferation, migration, and invasion as well as the expression of CyclinD1, p21, MMP-2, and MMP-9 proteins.

RESULTS

Compared with control cells, the rates of reduced growth of HepG2 cells in the OPD groups were significantly increased ($P < 0.05$), cell migration and invasion were significantly decreased ($P < 0.05$), the levels of CyclinD1, MMP-2, and MMP-9 proteins were significantly decreased ($P < 0.05$), p21 protein expression was significantly increased ($P < 0.05$), miR-519d-3p expression was significantly increased ($P < 0.05$), and the levels of EIF4E mRNA and protein were significantly decreased ($P < 0.05$). MiR-519d-3p negatively regulated EIF4E expression in HepG2 cells. Overexpression of miR-519d-3p or inhibition of EIF4E inhibited the proliferation, migration, and invasion of HepG2 cells. Inhibition of miR-519d-3p expression partially reversed the inhibitory effect of OPD on the proliferation, migration, and invasion of HepG2 cells.

CONCLUSION

OPD inhibits the proliferation, migration, and invasion of hepatoma cells possibly by regulating the expression of miR-519d-3p/EIF4E.

© The Author(s) 2019. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Ophiopogonin D; miR-519d-3p; EIF4E; Cell proliferation; Migration; Invasion

Shen P, Wang ZF. Ophiopogonin D inhibits proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells by regulating miR-519d-3p/EIF4E expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2019; 27(24): 1473-1482

URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v27/i24/1473.htm>
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v27.i24.1473>

摘要

背景

麦冬皂苷D(ophiopogonin D, OPD)是中药麦冬提取物中重要的单体成分且具有抗癌作用, 但是否具有抗肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)作用还未知。本研究假设OPD能够通过上调miR-519d-3p表达进而下调真核细胞翻译起始因子4E(eukaryotic translation initiation factor 4E, EIF4E)表达发挥抗HCC作用。

目的

探讨OPD对HCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响及可能的作用机制。

方法

培养HCC细胞HepG2和MHCC97, 不同浓度(2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$)的OPD作用48 h后, 四甲基噻唑蓝染色法(methylthiazolotrazolium, MTT)检测细胞增殖, Transwell检测细胞迁移和侵袭, 实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测细

胞中miR-519d-3p和EIF4E mRNA表达, Western blot检测细胞周期蛋白D1(CyclinD1)、p21、基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9和EIF4E蛋白表达。双荧光素酶报告基因实验验证miR-519d-3p和EIF4E之间关系。转染miR-519d-3p mimics、si-EIF4E构建miR-519d-3p过表达或EIF4E表达抑制的HepG2和MHCC97细胞, RT-qPCR检测细胞中miR-519d-3p表达或Western blot检测EIF4E蛋白表达验证转染效率。MTT、Transwell、Western blot分别检测过表达miR-519d-3p或抑制EIF4E表达对HepG2和MHCC97细胞增殖、迁移和侵袭, 及CyclinD1、p21、MMP-2和MMP-9蛋白表达的影响。

结果

与对照组比, OPD组HepG2细胞抑制率显著升高($P < 0.05$), 迁移和侵袭数显著降低($P < 0.05$), HepG2细胞中CyclinD1、MMP-2和MMP-9蛋白表达显著降低($P < 0.05$), p21蛋白表达显著升高($P < 0.05$), miR-519d-3p表达显著升高($P < 0.05$), EIF4E mRNA和蛋白表达显著降低($P < 0.05$), 且呈浓度依赖性。miR-519d-3p在HepG2细胞中靶向负调控EIF4E表达。miR-519d-3p过表达或抑制EIF4E表达均可抑制HepG2细胞增殖、迁移和侵袭。抑制miR-519d-3p表达部分逆转了OPD对HepG2细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。

结论

OPD可能通过调控miR-519d-3p/EIF4E表达抑制HCC细胞的增殖、迁移和侵袭。

© The Author(s) 2019. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 肝癌; 麦冬皂苷D; miR-519d-3p; EIF4E; 细胞增殖; 迁移; 侵袭

核心提要: 麦冬皂苷D可抑制HCC细胞增殖、迁移和侵袭, 其作用机制与调控miR-519d-3p/EIF4E表达有关。

申鹏, 汪正飞. 麦冬皂苷D通过调控miR-519d-3p/EIF4E表达对肝癌细胞增殖、迁移、侵袭的实验研究. *世界华人消化杂志* 2019; 27(24): 1473-1482
URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v27/i24/1473.htm>
DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v27.i24.1473>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC), 是常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁人类的生命健康。HCC治疗以常规手术切除为主, 辅助放疗和化疗。但目前, HCC的治疗效果不佳, 患者预后较差, 易发生早期侵袭和转移^[1,2]。因此, 寻找能够抑制HCC转移和侵袭的药物具有重要意义。麦冬是百合科沿阶草属植物麦冬的肉质块根, 具有保护血管、抗心肌缺血、降血糖等功效, 在中医临床中

广泛使用^[3,4]. 常用的中药材. 麦冬皂苷D(ophiopogonin D, OPD)是麦冬提取物中重要的单体成分, 同样具有多种生物学效应^[5]. 研究显示, OPD可能通过受体相互作用蛋白1/混合谱系激酶结构区域样蛋白通路诱导前列腺癌细胞程序性坏死抑制其生长^[6]. OPD可能通过下调细胞周期相关蛋白B1表达, 阻滞细胞周期进展, 抑制人乳腺癌细胞生长^[7]. 但目前, OPD影响HCC细胞的生物学行为的相关研究还未见报道. miRNA是一类内源性的小分子非编码RNA, 可在转录后水平调控靶基因的表达, 进而影响肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭等生物学行为, 在肿瘤的发生和发展中发挥重要作用^[8]. 研究显示, miR-519d-3p在胃癌^[9]、乳腺癌^[10]等肿瘤中异常表达, 上调其表达可抑制肿瘤的增殖、迁移和侵袭, 是肿瘤治疗的潜在靶点. 但目前, miR-519d-3p在HCC中的作用还未知. 生物信息学软件预测显示, 真核细胞翻译起始因子4E(eukaryotic translation initiation factor 4E, EIF4E)是miR-519d-3p的靶基因. EIF4E是真核细胞翻译起始因子家族的一员, 也参与多种肿瘤的发生和发展过程. 研究显示, HCC组织中EIF4E表达升高, 其高表达的患者5年生存率降低, 可作为HCC的预后生物标记物^[11]. Ding等^[12]研究显示, EIF4E参与HCC细胞的增殖和集落形成. 本研究以HCC细胞HepG2和MHCC97为研究对象, 主要探讨了OPD对HCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 并以miR-519d-3p/EIF4E轴为切入点, 分析OPD影响HCC细胞增殖、迁移和侵袭的可能机制, 以期HCC治疗药物的研发提供新思路.

1 材料和方法

1.1 材料 HCC细胞株HepG2和MHCC97, ATCC细胞库; OPD, 上海一飞生物科技有限公司, 纯度>98%; 胎牛血清, 杭州四季青; DMEM培养基, 北京索莱宝公司; Trizol试剂和Lipofectamine™2000试剂盒, 美国Invitrogen公司; miR-519d-3p mimics、阴性对照等, 上海吉玛制药技术有限公司; 四甲基噻唑蓝(methylthiazolotetrazolium, MTT)和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), 美国Sigma公司; 逆转录试剂盒, 北京诺博莱德科技有限公司; PCR试剂盒, 日本TOYOBO公司; 引物序列由上海生工生物技术公司提供; 放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白测定试剂盒和双荧光素酶活性检测试剂盒, 上海碧云天公司; 鼠抗人单克隆抗体细胞周期蛋白D1(CyclinD1)和p21抗体, 美国Santa Cruz公司; 鼠抗人单克隆抗体基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)和MMP-9, 福州迈新技术开发有限公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染: HepG2和MHCC97细胞, 均用

含10%胎牛血清的DMEM培养基置于37℃、5%CO₂、97%湿度的培养箱中培养. 待细胞生长密度达到80%时, 胰酶消化, 传代培养. 分别取对数生长期的HepG2、MHCC97细胞, 接种于6孔板中, 待细胞融合至60%时, 参照Lipofectamine™2000说明书. 分别转染转染miR-519d-3p模拟物(mimics)及阴性对照(miR-NC)、miR-519d-3p抑制剂(anti-miR-519d-3p)及阴性对照(anti-miR-NC)、EIF4E小干扰RNA(si-EIF4E)及乱序无义序列(si-NC). 转染24 h后, 更换新鲜培养基, 继续培养至48 h, 收集各组细胞进行后续实验.

1.2.2 细胞分组处理: 未转染的HepG2、MHCC97细胞均分为对照组: 细胞正常培养, 不做任何处理; OPD组: 含不同浓度^[6](2.5 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L) OPD的培养基作用48 h. 转染miR-519d-3p mimics、miR-NC、si-EIF4E、si-NC的HepG2和MHCC97细胞均培养48 h, 分别记为miR-519d-3p组、miR-NC组、si-EIF4E组和si-NC组. 转染anti-miR-519d-3p、anti-miR-NC的HepG2和MHCC97细胞均用含10 μmol/L OPD的培养基作用48 h, 分别记为OPD+anti-miR-519d-3p组、OPD+anti-miR-NC组.

1.2.3 MTT检测细胞增殖: 未转染或转染后的HepG2、MHCC97细胞, 调整细胞浓度为 2.5×10^4 个/mL, 接种于96孔板中, 每孔200 μL, 置于常规培养箱中培养. 细胞贴壁后按照1.2.2分组处理. 培养结束后, 每孔加入20 μL MTT溶液(5 g/L), 继续培养4 h. 然后吸弃培养基, 加入150 μL DMSO溶液, 反应5 min, 混匀后于全自动酶标仪490 nm处测定吸光度值.

1.2.3 Transwell检测细胞迁移和侵袭: 未转染或转染后的HepG2、MHCC97细胞, 用不含胎牛血清的DMEM培养基重悬, 调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL. 细胞迁移实验: 取100 μL细胞悬液加入至Transwell小室的上室, 下室加入500 μL含10%胎牛血清的DMEM培养基, 上室细胞按照1.2.2处理后, 吸弃培养基. 取出小室, PBS清洗细胞, 经甲醛固定、结晶紫染色后, 倒置显微镜下观察、拍照, 计算迁移细胞数目. 细胞侵袭实验: 不含胎牛血清的DMEM培养基稀释Matrigel胶, 加入到Transwell小室的上室. 然后取100 μL细胞悬液加入至铺有Matrigel胶的上室, 剩余操作与细胞迁移实验相同.

1.2.4 实时荧光定量PCR检测miR-519d-3p和EIF4E mRNA: Trizol试剂提取各组处理后细胞中总RNA. 紫外分光光度计检测RNA的纯度和浓度, 选取A260 nm/A280 nm值在1.8-2.0的范围内的RNA, 使用逆转录试剂盒将其逆转录为cDNA, -20℃保存. 然后以cDNA为模板行PCR扩增. PCR反应条件: 95℃ 5 min, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共45个循环. miR-519d-3p以U6为内参, EIF4E以GAPDH为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算miR-

519d-3p和EIF4E mRNA的相对表达水平。

1.2.5 Western blot蛋白表达: RIPA裂解液, 提取各组细胞中总蛋白, 于冰上充分裂解30 min, 4 ℃、12000 *g*离心10 min, 收集上清液, BCA法测定蛋白含量。取适量的蛋白, 加入上样缓冲液, 煮沸5 min使蛋白变性。取15 μg变性蛋白上样进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后, 将蛋白转至PVDF膜, 使用5%脱脂牛奶室温条件封闭, 封闭时间2 h。加入一抗, 4 ℃孵育过夜。TBST洗膜3次, 每次5 min。然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育1 h。TBST洗膜3次, 每次5 min。加入ECL显影液避光条件下进行显影, 凝胶成像系统曝光拍照。

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验: 生物信息学软件预测显示, EIF4E的3'UTR中存在与miR-519d-3p互补的核苷酸序列。将对数生长的HepG2细胞接种于6孔板中, 细胞融合至60%时, 使用Lipofectamine™2000将pmiRGLO-WT-EIF4E、pmiRGLO-MUT-EIF4E质粒分别与miR-519d-3p mimics和其阴性对照共转染至HepG2、MHCC97细胞。转染后6 h, 更换新鲜的培养基。继续培养至48 h, 收集各组细胞, 参照双荧光素酶活性检测试剂盒说明书操作, 对各组细胞的荧光素酶活性进行测定。

统计学处理 利用SPSS 22.0软件分析实验数据。计量资料以(Mean±SD)表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OPD对HCC细胞HepG2和MHCC97增殖、迁移和侵袭的影响 与对照组比较, OPD组HepG2、MHCC97细胞的抑制率、p21蛋白表达显著升高($P<0.05$), 迁移和侵袭数、CyclinD1、MMP-2和MMP-9蛋白表达显著降低($P<0.05$), 且不同浓度OPD组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。表明OPD可剂量依赖性抑制HepG2、MHCC97细胞增殖、迁移和侵袭(图1、表1和表2)。

2.2 OPD对HCC细胞HepG2和MHCC97中miR-519d-3p和EIF4E表达的影响 与对照组比, OPD组HepG2、MHCC97细胞中miR-519d-3p表达显著升高($P<0.05$), EIF4E mRNA和蛋白表达显著降低($P<0.05$), 且不同浓度OPD组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$), 表明OPD可剂量依赖性促进HepG2、MHCC97细胞中miR-519d-3p表达, 抑制EIF4E表达(图2和表3)。

2.3 miR-519d-3p靶向调控EIF4E的表达 TargetScan等生物信息学软件预测显示, EIF4E的3'UTR中含有与miR-519d-3p互补的核苷酸序列(图3A), 与共转染WT-EIF4E的miR-NC组比较, miR-519d-3p组HepG2、MHCC97细胞荧光素酶活性显著降低($P<0.05$), 而与共转染MUT-EIF4E的miR-NC组比较, miR-519d-3p组

HepG2、MHCC97细胞荧光素酶活性比较差异无统计学意义($P>0.05$)(表4), 说明miR-519d-3p可与EIF4E的3'UTR序列上的结合位点靶向结合。miR-519d-3p组HepG2、MHCC97细胞中EIF4E蛋白表达显著低于miR-NC($P<0.05$), anti-miR-519d-3p组HepG2、MHCC97细胞中EIF4E蛋白表达显著高于miR-NC($P<0.05$)(表5)。表明miR-519d-3p在HepG2、MHCC97细胞中靶向负调控EIF4E表达。

2.4 miR-519d-3p过表达对HCC细胞HepG2和MHCC97增殖、迁移和侵袭的影响 miR-519d-3p组HepG2、MHCC97细胞中miR-519d-3p表达水平显著高于miR-NC组($P<0.05$), 表明miR-519d-3p mimics转染成功, 细胞中miR-519d-3p过表达。与miR-NC组比较, miR-519d-3p组HepG2、MHCC97细胞抑制率、p21蛋白表达显著升高($P<0.05$), 迁移和侵袭数, 及CyclinD1、MMP-2和MMP-9蛋白表达显著降低($P<0.05$), 表明miR-519d-3p过表达可抑制HepG2、MHCC97细胞增殖、迁移和侵袭(图4、表6和表7)。

2.5 抑制EIF4E表达对HCC细胞HepG2和MHCC97增殖、迁移和侵袭的影响 si-EIF4E组HepG2、MHCC97细胞中EIF4E蛋白表达显著低于si-NC组($P<0.05$), 表明EIF4E小干扰RNA转染成功, 细胞中EIF4E表达受到抑制。与miR-NC组比较, miR-519d-3p组HepG2、MHCC97细胞抑制率、p21蛋白表达显著升高($P<0.05$), 迁移和侵袭数, 及CyclinD1、MMP-2和MMP-9蛋白表达显著降低($P<0.05$), 表明抑制EIF4E表达可抑制HepG2、MHCC97细胞的增殖、迁移和侵袭(图5、表8和表9)。

2.6 抑制miR-519d-3p表达逆转了OPD(10 μmol/L)对HCC细胞HepG2和MHCC97增殖、迁移和侵袭的作用 与OPD+anti-miR-NC组比, OPD+anti-miR-519d-3p组HepG2、MHCC97细胞抑制率、miR-519d-3p、p21蛋白表达均显著降低($P<0.05$), 迁移和侵袭数, 及EIF4E、CyclinD1、MMP-2和MMP-9蛋白表达显著升高($P<0.05$), 表明抑制miR-519d-3p表达部分逆转了OPD对HepG2、MHCC97细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用(图6、表10和表11)。

3 讨论

天然产物具有抗肿瘤效果, 多数从植物中提取的天然化合物是抗肿瘤药物的先导化合物^[13]。OPD是传统中草药麦冬的主要活性单体, 在心血管、心肌损伤等方面发挥保护作用^[14,15]。研究显示, OPD通过抑制核转录因子kappa B、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B和转录激活蛋白-1途径抑制肺癌细胞增殖, 增强紫杉醇诱导的肺癌死亡^[16]。OPD可通过抑制p38的磷酸化以及MMP-9的表达抑制黑素瘤MDA-MB-435细胞的增殖和侵袭,

表 1 OPD对HepG2细胞增殖、迁移和侵袭的影响(mean ± SD, n = 12)

分组	抑制率(%)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	CyclinD1蛋白	p21蛋白	MMP-2蛋白	MMP-9蛋白
对照组	0.00 ± 0.00	126.34 ± 10.48	109.23 ± 9.24	0.73 ± 0.07	0.24 ± 0.03	0.77 ± 0.06	0.75 ± 0.07
OPD 2.5 μmol/L组	17.28 ± 1.75 ^a	92.41 ± 9.14 ^a	81.42 ± 8.01 ^a	0.61 ± 0.06 ^a	0.39 ± 0.04 ^a	0.64 ± 0.05 ^a	0.59 ± 0.05 ^a
OPD 5 μmol/L组	39.46 ± 3.57 ^{ac}	71.26 ± 7.24 ^{ac}	59.37 ± 5.44 ^{ac}	0.48 ± 0.05 ^{ac}	0.52 ± 0.05 ^{ac}	0.52 ± 0.04 ^{ac}	0.48 ± 0.04 ^{ac}
OPD 10 μmol/L组	61.14 ± 6.28 ^{ace}	53.41 ± 5.22 ^{ace}	41.69 ± 4.83 ^{ace}	0.27 ± 0.03 ^{ace}	0.68 ± 0.06 ^{ace}	0.37 ± 0.03 ^{ace}	0.32 ± 0.03 ^{ace}
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与对照组比较, ^a*P*<0.05; 与OPD 2.5 μmol/L组比较, ^c*P*<0.05; 与OPD 5 μmol/L组比较, ^e*P*<0.05. OPD: 麦冬皂苷D; CyclinD1: 细胞周期蛋白D1; MMP: 基质金属蛋白酶.

表 2 OPD对MHCC97细胞增殖、迁移侵袭的影响(mean ± SD, n = 12)

分组	抑制率(%)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	CyclinD1蛋白	p21蛋白	MMP-2蛋白	MMP-9蛋白
对照组	0.00 ± 0.01	105.32 ± 11.22	89.65 ± 8.33	0.68 ± 0.06	0.29 ± 0.03	0.65 ± 0.06	0.78 ± 0.07
OPD 2.5 μmol/L组	19.65 ± 1.84 ^a	81.65 ± 8.43 ^a	71.61 ± 7.42 ^a	0.56 ± 0.05 ^a	0.44 ± 0.04 ^a	0.54 ± 0.05 ^a	0.65 ± 0.05 ^a
OPD 5 μmol/L组	31.26 ± 3.45 ^{ac}	62.98 ± 6.33 ^{ac}	56.44 ± 5.31 ^{ac}	0.44 ± 0.04 ^{ac}	0.58 ± 0.05 ^{ac}	0.41 ± 0.04 ^{ac}	0.53 ± 0.05 ^{ac}
OPD 10 μmol/L组	48.61 ± 4.33 ^{ace}	42.87 ± 4.39 ^{ace}	34.29 ± 4.63 ^{ace}	0.29 ± 0.03 ^{ace}	0.73 ± 0.07 ^{ace}	0.26 ± 0.03 ^{ace}	0.34 ± 0.03 ^{ace}
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与对照组比较, ^a*P*<0.05; 与OPD 2.5 μmol/L组比较, ^c*P*<0.05; 与OPD 5 μmol/L组比较, ^e*P*<0.05. OPD: 麦冬皂苷D; CyclinD1: 细胞周期蛋白D1; MMP: 基质金属蛋白酶.

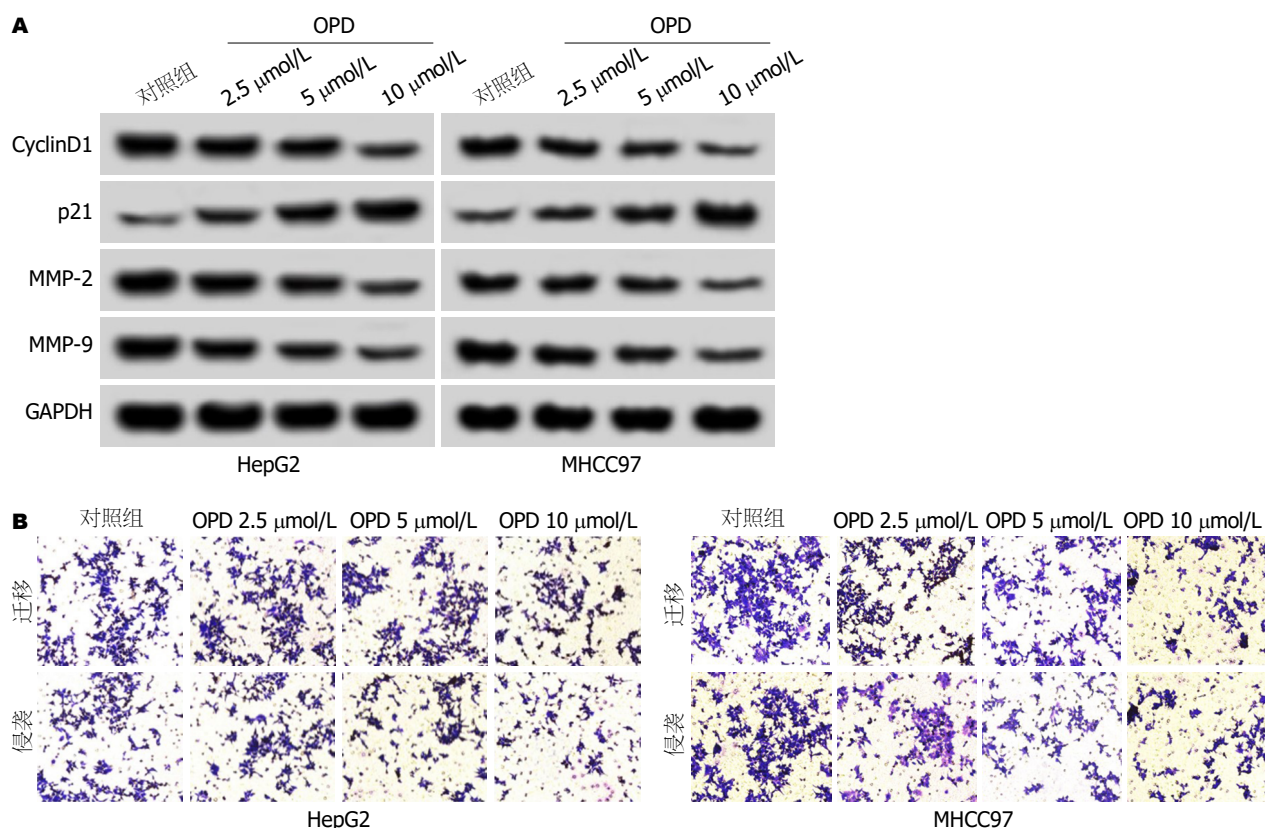


图 1 OPD对HCC HepG2和MHCC97细胞增殖、迁移和侵袭的影响. A: Western blot检测OPD作用HepG2、MHCC97细胞后p21、CyclinD1、MMP-2和MMP-9蛋白表达; B: Transwell检测OPD作用肝癌细胞后迁移和侵袭能力. OPD: 麦冬皂苷D; CyclinD1: 细胞周期蛋白D1; MMP: 基质金属蛋白酶.

表 3 OPD对HCC细胞中miR-519d-3p和EIF4E表达的影响(mean ± SD, n = 12)

分组	HepG2			MHCC97		
	miR-519d-3p	EIF4E mRNA	EIF4E蛋白	miR-519d-3p	EIF4E mRNA	EIF4E蛋白
对照组	1.00 ± 0.09	1.02 ± 0.09	0.62 ± 0.06	1.00 ± 0.08	1.01 ± 0.07	0.57 ± 0.05
OPD 2.5 μmol/L组	2.11 ± 0.21 ^a	0.81 ± 0.08 ^a	0.49 ± 0.04 ^a	1.62 ± 0.16 ^a	0.87 ± 0.07 ^a	0.46 ± 0.04 ^a
OPD 5 μmol/L组	3.02 ± 0.29 ^{ac}	0.63 ± 0.06 ^{ac}	0.33 ± 0.03 ^{ac}	2.51 ± 0.22 ^{ac}	0.75 ± 0.06 ^{ac}	0.35 ± 0.03 ^{ac}
OPD 10 μmol/L组	4.27 ± 0.38 ^{ace}	0.42 ± 0.04 ^{ace}	0.21 ± 0.03 ^{ace}	3.12 ± 0.31 ^{ace}	0.57 ± 0.05 ^{ace}	0.24 ± 0.03 ^{ace}
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与对照组比较, ^aP<0.05; 与OPD 2.5 μmol/L组比较, ^bP<0.05; 与OPD 5 μmol/L组比较, ^cP<0.05. OPD: 麦冬皂苷D; EIF4E: 真核细胞翻译起始因子4E.

表 4 双荧光素酶报告实验(mean ± SD, n = 6)

分组	HepG2		MHCC97	
	WT-EIF4E	MUT-EIF4E	WT-EIF4E	MUT-EIF4E
miR-NC	1.02 ± 0.09	0.98 ± 0.08	1.00 ± 0.08	1.04 ± 0.09
miR-519d-3p	0.35 ± 0.03 ^a	0.99 ± 0.09	0.47 ± 0.04 ^a	1.02 ± 0.07
P值	0.000	0.843	0.000	0.677

与miR-NC组比较, ^aP<0.05. WT-EIF4E: 真核细胞翻译起始因子4E野生型荧光素酶载体; MUT-EIF4E: 真核细胞翻译起始因子4E突变型荧光素酶载体.

表 5 miR-519d-3p调控EIF4E蛋白表达(mean ± SD, n = 12)

分组	EIF4E蛋白	
	HepG2	MHCC97
miR-NC	0.63 ± 0.06	0.55 ± 0.05
miR-519d-3p	0.23 ± 0.03 ^a	0.19 ± 0.02 ^a
anti-miR-NC	0.60 ± 0.06	0.53 ± 0.04
anti-miR-519d-3p	0.96 ± 0.09 ^c	0.85 ± 0.07 ^c
P值	0.000	0.000

与miR-NC组比较, ^aP<0.05; 与anti-miR-NC组比较, ^cP<0.05. EIF4E: 真核细胞翻译起始因子4E.

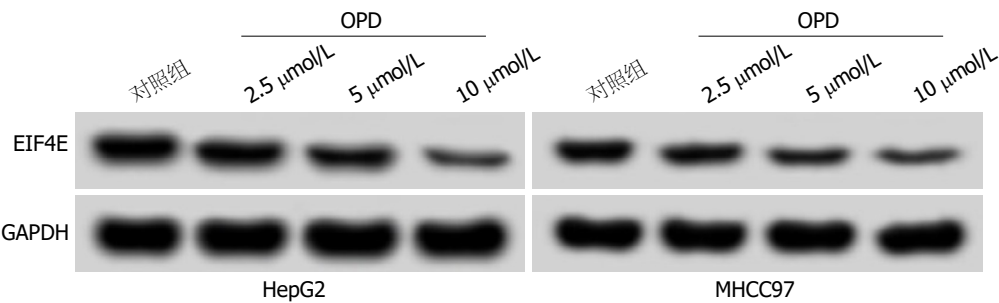


图 2 Western blot检测麦冬皂苷D作用肝癌细胞后EIF4E蛋白表达. EIF4E: 真核细胞翻译起始因子4E.

是黑素瘤治疗的候选药物^[17]. 目前, OPD对HCC细胞生物学行为的影响还未知. 本研究结果显示, OPD可抑制HCC HepG2细胞的增殖、迁移和侵袭, 下调HepG2细胞中CyclinD1、MMP-2和MMP-9蛋白表达, 上调p21蛋白表达, 提示OPD在一定程度上发挥抗HCC的作用, 是HCC治疗的潜在药物.

miRNA参与肿瘤的发生和发展. miR-519d-3p是近年来新发现的一种miRNA. 有报道称, miR-519d-3p在结直肠癌组织和细胞系中表达下调, 过表达miR-519d-3p通过直接靶向肌钙蛋白相关蛋白表达显著抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 并阻滞细胞周期G0/G1期, 诱导结直肠癌细胞凋亡^[18]. 过表达miR-519d-3p可抑

表 6 miR-519d-3p过表达对HepG2细胞增殖、迁移和侵袭的影响(mean ± SD, n = 6)

分组	miR-519d-3p	抑制率(%)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	CyclinD1蛋白	p21蛋白	MMP-2蛋白	MMP-9蛋白
miR-NC	1.01 ± 0.09	5.18 ± 0.53	115.69 ± 10.27	98.17 ± 9.36	0.71 ± 0.07	0.22 ± 0.03	0.75 ± 0.07	0.72 ± 0.07
miR-519d-3p	3.92 ± 0.38 ^a	48.32 ± 4.18 ^a	56.98 ± 5.52 ^a	41.28 ± 4.58 ^a	0.34 ± 0.03 ^a	0.62 ± 0.06 ^a	0.41 ± 0.04 ^a	0.39 ± 0.03 ^a
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与miR-NC组比较, ^aP<0.05. CyclinD1: 细胞周期蛋白D1; MMP: 基质金属蛋白酶.

表 7 miR-519d-3p过表达对MHCC97细胞增殖、迁移和侵袭的影响(mean ± SD, n = 6)

分组	miR-519d-3p	抑制率(%)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	CyclinD1蛋白	p21蛋白	MMP-2蛋白	MMP-9蛋白
miR-NC	1.00 ± 0.08	6.32 ± 0.63	108.32 ± 10.58	86.32 ± 8.41	0.67 ± 0.07	0.28 ± 0.03	0.64 ± 0.07	0.79 ± 0.07
miR-519d-3p	2.86 ± 0.27 ^a	39.54 ± 3.88 ^a	52.63 ± 5.66 ^a	45.18 ± 4.91 ^a	0.34 ± 0.03 ^a	0.71 ± 0.07 ^a	0.28 ± 0.03 ^a	0.36 ± 0.03 ^a
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与miR-NC组比较, ^aP<0.05. CyclinD1: 细胞周期蛋白D1; MMP: 基质金属蛋白酶.

表 8 抑制EIF4E表达对HepG2细胞增殖、迁移和侵袭的影响(mean ± SD, n = 6)

分组	EIFE蛋白	抑制率(%)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	CyclinD1蛋白	p21蛋白	MMP-2蛋白	MMP-9蛋白
si-NC	0.62 ± 0.06	6.24 ± 0.63	118.65 ± 10.27	101.25 ± 8.64	0.73 ± 0.07	0.25 ± 0.03	0.74 ± 0.06	0.71 ± 0.07
si-EIF4E	0.23 ± 0.03 ^a	46.27 ± 4.21 ^a	59.41 ± 5.25 ^a	48.22 ± 4.58 ^a	0.38 ± 0.04 ^a	0.59 ± 0.05 ^a	0.43 ± 0.04 ^a	0.38 ± 0.04 ^a
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与si-NC组比较, ^aP<0.05. EIF4E: 真核细胞翻译起始因子4E; CyclinD1: 细胞周期蛋白D1; MMP: 基质金属蛋白酶.

表 9 抑制EIF4E表达对MHCC97细胞增殖、迁移和侵袭的影响(mean ± SD, n = 6)

分组	EIFE蛋白	抑制率(%)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	CyclinD1蛋白	p21蛋白	MMP-2蛋白	MMP-9蛋白
si-NC	0.55 ± 0.05	5.98 ± 0.57	101.58 ± 10.32	88.14 ± 8.81	0.69 ± 0.06	0.27 ± 0.03	0.63 ± 0.06	0.77 ± 0.07
si-EIF4E	0.21 ± 0.02 ^a	32.14 ± 3.58 ^a	56.14 ± 5.31 ^a	49.36 ± 4.27 ^a	0.35 ± 0.03 ^a	0.68 ± 0.06 ^a	0.31 ± 0.03 ^a	0.39 ± 0.04 ^a
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与si-NC组比较, ^aP<0.05. EIF4E: 真核细胞翻译起始因子4E; CyclinD1: 细胞周期蛋白D1; MMP: 基质金属蛋白酶.

A WT-EIF4E 3' UTR 5' aggcaguaguucagucACUUUUac 3'
miR-519d-3p 3' gugagauuuccuccGUGAAAc 5'
MUT-EIF4E 3' UTR 5' aggcaguaguucagucGCUCGAac 3'

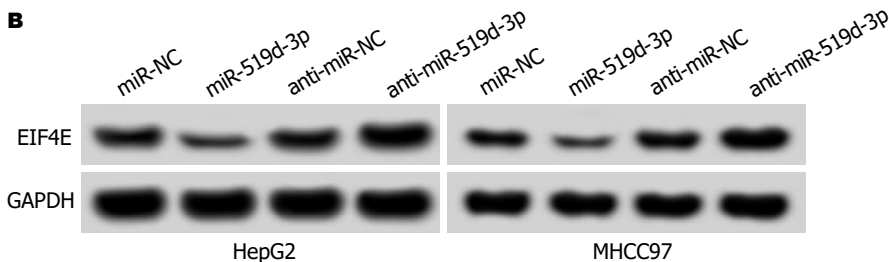


图 3 miR-519d-3p靶向调控EIF4E的表达. A: EIF4E的3' UTR中含有与miR-519d-3p互补的核苷酸序列; B: Western blot检测miR-519d-3p对EIF4E蛋白表达的影响. EIF4E: 真核细胞翻译起始因子4E.

表 10 抑制miR-519d-3p表达逆转了OPD对HCC HepG2细胞增殖、迁移和侵袭的作用(mean ± SD, n = 12)

分组	miR-519d-3p	EIF4E蛋白	抑制率(%)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	CyclinD1蛋白	p21蛋白	MMP-2蛋白	MMP-9蛋白
对照组	1.00 ± 0.08	0.64 ± 0.06	0.00 ± 0.00	116.37 ± 10.54	103.65 ± 9.14	0.74 ± 0.07	0.23 ± 0.03	0.76 ± 0.06	0.73 ± 0.06
OPD组	4.02 ± 0.39 ^a	0.25 ± 0.03 ^a	58.14 ± 5.22 ^a	52.41 ± 5.28 ^a	43.66 ± 4.28	0.29 ± 0.03 ^a	0.66 ± 0.06 ^a	0.35 ± 0.03 ^a	0.31 ± 0.03 ^a
OPD+anti-miR-NC	4.11 ± 0.41	0.22 ± 0.03	60.35 ± 6.17	50.29 ± 5.27	41.58 ± 4.27	0.25 ± 0.03	0.69 ± 0.07	0.33 ± 0.03	0.28 ± 0.03
OPD+anti-miR-519d-3p	1.96 ± 0.19 ^c	0.51 ± 0.05 ^c	19.68 ± 1.92 ^c	82.62 ± 8.04 ^c	71.36 ± 7.24 ^c	0.61 ± 0.06 ^c	0.37 ± 0.04 ^c	0.59 ± 0.05 ^c	0.56 ± 0.05 ^c
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与对照组比较, ^a*P*<0.05; 与OPD+anti-miR-NC组比较, ^c*P*<0.05. OPD: 麦冬皂苷D; EIF4E: 真核细胞翻译起始因子4E; CyclinD1: 细胞周期蛋白D1; MMP: 基质金属蛋白酶.

表 11 抑制miR-519d-3p表达逆转了OPD对HCC MHCC97细胞增殖、迁移侵袭的作用(mean ± SD, n = 12)

分组	miR-519d-3p	EIF4E蛋白	抑制率(%)	迁移细胞数(个)	侵袭细胞数(个)	CyclinD1蛋白	p21蛋白	MMP-2蛋白	MMP-9蛋白
对照组	1.01 ± 0.09	0.57 ± 0.05	0.00 ± 0.01	109.32 ± 9.47	89.32 ± 8.47	0.66 ± 0.06	0.30 ± 0.03	0.64 ± 0.06	0.79 ± 0.07
OPD组	2.79 ± 0.28 ^a	0.21 ± 0.01 ^a	41.65 ± 4.22 ^a	46.35 ± 4.47 ^a	36.29 ± 3.58	0.27 ± 0.03 ^a	0.75 ± 0.07 ^a	0.25 ± 0.03 ^a	0.35 ± 0.03 ^a
OPD+anti-miR-NC	2.84 ± 0.27	0.20 ± 0.03	43.18 ± 4.27	44.25 ± 4.42	34.17 ± 3.44	0.26 ± 0.03	0.76 ± 0.07	0.24 ± 0.03	0.33 ± 0.03
OPD+anti-miR-519d-3p	1.53 ± 0.15 ^c	0.46 ± 0.04 ^c	15.98 ± 1.89 ^c	79.28 ± 7.36 ^c	68.21 ± 6.22 ^c	0.54 ± 0.05 ^c	0.39 ± 0.04 ^c	0.52 ± 0.05 ^c	0.68 ± 0.06 ^c
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与对照组比较, ^a*P*<0.05; 与OPD+anti-miR-NC组比较, ^b*P*<0.05. OPD: 麦冬皂苷D; EIF4E: 真核细胞翻译起始因子4E; CyclinD1: 细胞周期蛋白D1; MMP: 基质金属蛋白酶.

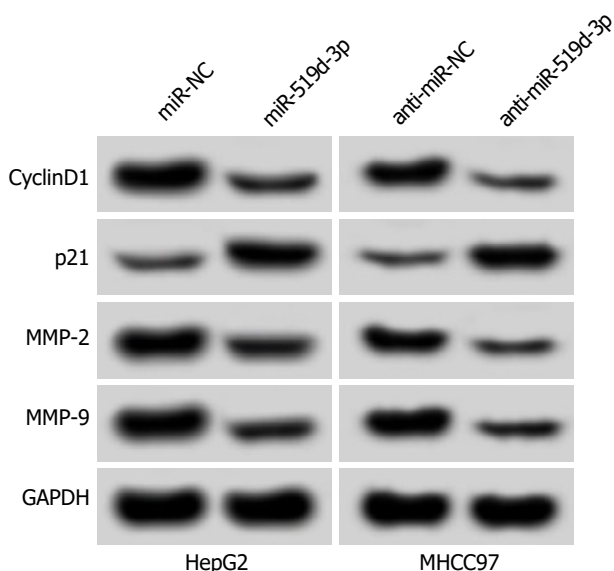


图 4 Western blot检测miR-519d-3p过表达对HCC细胞p21、CyclinD1、MMP-2和MMP-9蛋白表达的影响. CyclinD1: 细胞周期蛋白D1; MMP: 基质金属蛋白酶.

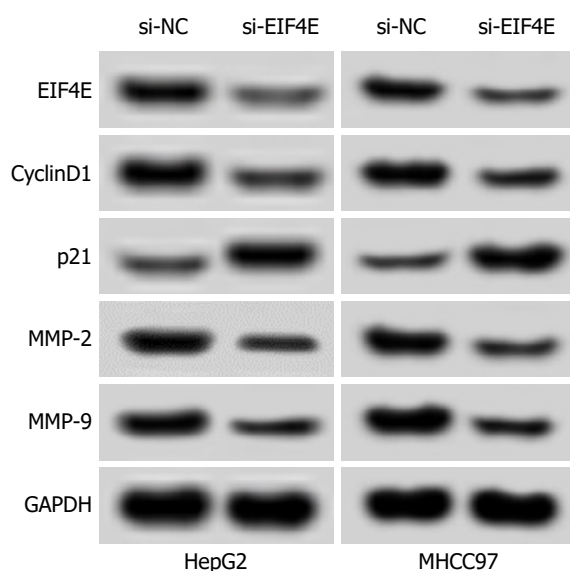


图 5 Western blot检测抑制EIF4E表达对HCC细胞p21、CyclinD1、MMP-2和MMP-9蛋白表达的影响. EIF4E: 真核细胞翻译起始因子4E; CyclinD1: 细胞周期蛋白D1; MMP: 基质金属蛋白酶.

制乳腺癌细胞的增殖和迁移, 是乳腺癌治疗的潜在靶

标^[10]. 但是, miR-519d-3p对HCC细胞生物学行为的影响

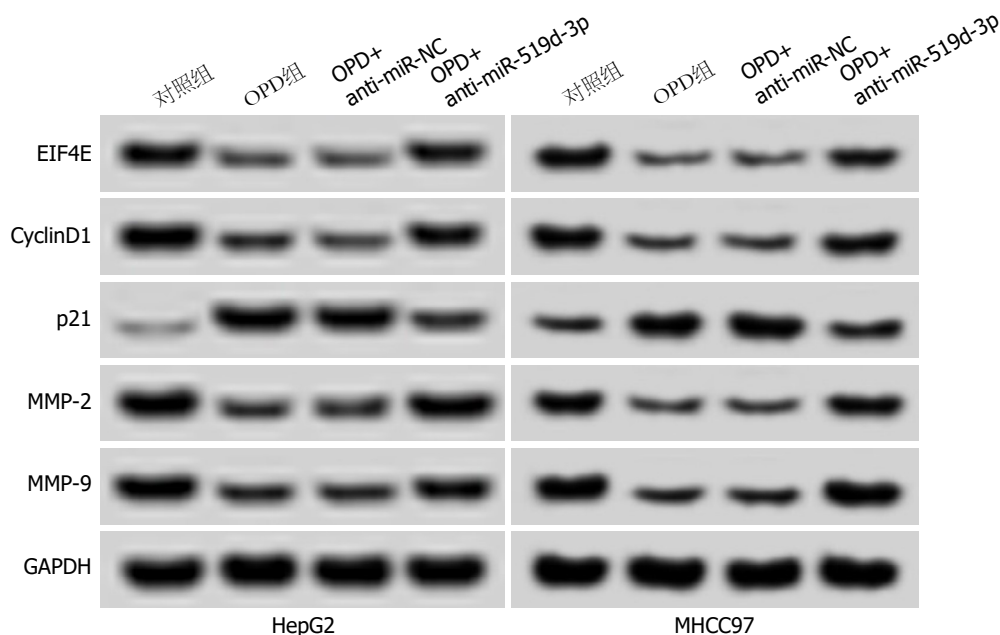


图 6 Western blot检测抑制miR-519d-3p表达对OPD处理的HCC细胞p21、CyclinD1、MMP-2和MMP-9蛋白表达的影响。OPD: 麦冬皂苷D; EIF4E: 真核细胞翻译起始因子4E; CyclinD1: 细胞周期蛋白D1; MMP: 基质金属蛋白酶。

还未知。本研究显示, 过表达miR-519d-3p可抑制HCC细胞增殖、迁移和侵袭, 提示miR-519d-3p可能是HCC细胞治疗的分子靶点。此外, OPD可促进HCC细胞中miR-519d-3p的表达, 而抑制miR-519d-3p表达逆转了OPD对HCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 提示OPD通过上调细胞中miR-519d-3p表达HCC细胞的增殖、迁移和侵袭。

miRNA通常与靶mRNA的3'端UTR区结合, 抑制mRNA翻译或裂解mRNA, 通过调控基因的表达发挥作用^[19,20]。本研究首先通过生物信息学软件发现, EIF4E的3'UTR中含有与miR-519d-3p互补的核苷酸序列, 提示miR-519d-3p可能调控EIF4E表达。然后通过双荧光素酶报告基因实验证实了miR-519d-3p在HCC细胞中负调控EIF4E表达。这也与OPD促进HCC细胞miR-519d-3p表达, 而抑制EIF4E表达的结果一致。此外, 抑制EIF4E表达可抑制HCC细胞的增殖、迁移和侵袭, 并下调细胞中CyclinD1、MMP-2和MMP-9蛋白表达, 上调p21蛋白表达进一步提示OPD可能通过上调HCC细胞中miR-519d-3p进而下调EIF4E表达抑制HCC细胞的增殖、迁移和侵袭。

综上所述, OPD可抑制HCC细胞增殖、迁移和侵袭, 其作用机制可能与促进细胞miR-519d-3p表达进而下调EIF4E表达有关, 是潜在的HCC治疗药物。但本研究还存在不足之处, 仅在细胞层面进行了初步探讨, 接下来将通过动物实验进一步验证OPD抑制HCC发生发展的作用及其他可能的作用机制。

文章亮点

实验背景

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)易复发和转移, 缺乏有效的治疗药物。麦冬皂苷D(ophiopogonin D, OPD)是中药麦冬提取物中重要的单体成分, 在乳腺癌、肺癌、黑素瘤等肿瘤中发挥抗癌作用, 但是对HCC的影响还未知。本研究探讨OPD对HCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响及作用机制, 以期HCC治疗药物的研发提供新思路。

实验动机

本研究的主题是OPD是否抑制HCC细胞的增殖、迁移和侵袭及其是否通过调控miR-519d-3p/真核细胞翻译起始因子4E(eukaryotic translation initiation factor 4E, EIF4E)轴表达发挥作用, 目的是为了探究OPD是否发挥抗HCC作用及其可能的作用机制。

实验目标

本研究的主要目标是探讨OPD是否具有抗HCC作用及作用机制, 通过实验明确了OPD可能通过调控miR-519d-3p/EIF4E抑制HCC细胞的增殖、迁移和侵袭, 接下来进一步通过动物模型实验进一步验证OPD的抗HCC作用, 可能为临床HCC治疗药物的研发提供新途径。

实验方法

本研究采用四甲基噻唑蓝染色法检测了细胞增殖,

Transwell检测了细胞迁移和侵袭, 实时荧光定量PCR检测了细胞中miR-519d-3p和EIF4E mRNA表达, Western blot检测了细胞周期蛋白D1、p21、基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9和EIF4E蛋白表达, 双荧光素酶报告基因实验验证了miR-519d-3p与EIF4E的3'端UTR能否靶向结合。

实验结果

本研究达到实验目标。实验结果表明OPD可抑制HCC细胞增殖、迁移和侵袭, 在一定程度上发挥抗HCC作用, 同时, OPD通过调控上调miR-519d-3p表达, 进而抑制EIF4E表达来抑制HCC细胞的增殖、迁移和侵袭。

实验结论

本研究首次发现OPD可抑制HCC细胞的增殖、迁移和侵袭, 且其作用机制与调控miR-519d-3p/EIF4E轴表达有关。OPD可能具有开发为治疗HCC药物的潜在价值。

展望前景

本研究不足之处是还未进行动物相关实验, 仅在细胞层面进行了探讨, 接下来将通过动物实验探讨OPD对HCC小鼠肿瘤生长的影响及其他可能的作用机制。方法是通过二乙基亚硝胺腹腔注射和CCl₄灌胃方法构建小鼠HCC模型, 灌胃OPD, 探究OPD对肿瘤生长的影响, 以及建立接种miR-519d-3p过表达等HCC细胞建立移植瘤裸鼠, 探讨miR-519d-3p过表达对移植瘤裸鼠肿瘤生长的影响。

4 参考文献

- 1 李相成, 王宏伟, 李长贤. 肝癌综合治疗的现状与展望. 中华消化外科杂志 2018; 17: 433-436 [DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2018.05.004]
- 2 赵立涵, 刘立, 蒋波, 甄根深, 李娜. MicroRNA-144-3p对肝癌细胞增殖、侵袭转移的影响及其机制. 临床和实验医学杂志 2018; 270: 41-44
- 3 李晶, 苏薇薇, 王永刚, 彭维, 吴忠, 李沛波. 麦冬多糖提取工艺的优选及降血糖作用研究. 中医药导报 2017; 24: 52-54 [DOI: 10.3390/j.issn.1672-951X.2017.24.018]
- 4 吴发明, 杨瑞山, 陶玲, 李敏, 高思佳, 包小红, 周娟. 基于药材安全性和有效性的综合评价探讨多效唑在麦冬中的应用. 中国药理学杂志 2017; 1: 24-28
- 5 Tong YN, Yang LY, Yang Y, Song Z, Peng LS, Gao JN, Zeng H, Zou QM, Sun HW, Mao XH. An immunopotentiator, ophiopogonin D, encapsulated in a nanoemulsion as a robust adjuvant to improve vaccine efficacy. *Acta Biomater* 2018; 77: 255-267 [PMID: 30031164 DOI: 10.1016/j.actbio.2018.07.034]
- 6 王佳佳, 卢宗亮, 孔亚, 宋伟, 王贺, 许红霞. 麦冬皂苷D"通过RIP1/MLKL诱导前列腺癌PC3细胞程序性坏死. 第三军医大学

- 学报 2017; 39: 201-207 [DOI: 10.16016/j.1000-5404.201609037]
- 7 Zang QQ, Zhang L, Gao N, Huang C. Ophiopogonin D inhibits cell proliferation, causes cell cycle arrest at G2/M, and induces apoptosis in human breast carcinoma MCF-7 cells. *J Integr Med* 2016; 14: 51-59 [PMID: 26778229 DOI: 10.1016/S2095-4964(16)60238-8]
- 8 王明阳, 王光磊, 陈新亮, 张巍, 龙淼. MicroRNA的生物学功能及其与肿瘤诊断和治疗的研究进展. *动物医学进展* 2018; 39: 95-98 [DOI: 10.3969/j.issn.1007-5038.2018.01.017]
- 9 Li YY, Shao JP, Zhang SP, Xing GQ, Liu HJ. miR-519d-3p Inhibits Cell Proliferation and Invasion of Gastric Cancer by Downregulating B-Cell Lymphoma 6. *Cytogenet Genome Res* 2018; 154: 12-19 [PMID: 29510377 DOI: 10.1159/000487372]
- 10 Li D, Song H, Wu T, Xie D, Hu J, Zhao J, Shen Q, Fang L. MiR-519d-3p suppresses breast cancer cell growth and motility via targeting LIM domain kinase 1. *Mol Cell Biochem* 2018; 444: 169-178 [PMID: 29188531 DOI: 10.1007/s11010-017-3241-4]
- 11 Jiang XM, Yu XN, Huang RZ, Zhu HR, Chen XP, Xiong J, Chen ZY, Huang XX, Shen XZ, Zhu JM. Prognostic significance of eukaryotic initiation factor 4E in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016; 142: 2309-2317 [PMID: 27601163 DOI: 10.1007/s00432-016-2232-2]
- 12 Ding J, Li Y, Fan H, Xu W, Gao R, Bai S, Zhu Z, Yang W, Gong Y, Yang J, Zhou J. Knockdown of PSMC3IP suppresses the proliferation and xenografted tumorigenesis of hepatocellular carcinoma cell. *J Cell Biochem* 2019; 120: 5449-5458 [PMID: 30362169 DOI: 10.1002/jcb.27824]
- 13 晏晨, 张云东, 王星慧, 骆衡. 川黄柏果实中的化学成分及抗肿瘤活性. *天然产物研究与开发* 2017; 2: 1270-1276 [DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.8.002]
- 14 王远, 王宇光, 马增春, 汤响林, 梁乾德, 谭洪玲, 肖成荣, 赵永红, 高月. 麦冬皂苷D通过降低自噬抑制血管紧张素 II 诱导的心肌肥大. *中国药理学通报* 2016; 32: 1370-1376 [DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2016.10.009]
- 15 任思嘉, 徐焕华, 李明, 郝斐然, 马增春, 汤响林, 梁乾德, 谭洪玲, 肖成荣, 王宇光, 高月. 麦冬皂苷D对大鼠心肌细胞H9c2的细胞毒性. *中国药理学与毒理学杂志* 2017; 31: 325-331 [DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2017.04.005]
- 16 Lee JH, Kim C, Lee SG, Yang WM, Um JY, Sethi G, Ahn KS. Ophiopogonin D modulates multiple oncogenic signaling pathways, leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human lung cancer cells. *Phytomedicine* 2018; 40: 165-175 [PMID: 29496169 DOI: 10.1016/j.phymed.2018.01.002]
- 17 Zhang YY, Meng C, Zhang XM, Yuan CH, Wen MD, Chen Z, Dong DC, Gao YH, Liu C, Zhang Z. Ophiopogonin D attenuates doxorubicin-induced autophagic cell death by relieving mitochondrial damage in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2015; 352: 166-174 [PMID: 25378375 DOI: 10.1124/jpet.114.219261]
- 18 Ye X, Lv H. MicroRNA-519d-3p inhibits cell proliferation and migration by targeting TROAP in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother* 2018; 105: 879-886 [PMID: 30021381 DOI: 10.1016/j.biopha.2018.04.114]
- 19 朱斌路, 姜红堃. 竞争性内源RNA与心血管疾病发病机制的研究进展. *中华实用儿科临床杂志* 2018; 33: 1033-1036 [DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-428X.2018.13.018]
- 20 孙雪梅, 郑书贤, 王瑞鸽, 王照岩, 李洪利, 尹崇高, 张宝刚. miR-424通过结合ARK5 mRNA 3' -UTR抑制胶质瘤细胞侵袭. *中国生物化学与分子生物学报* 2017; 5: 104-109

编辑: 王禹乔 电编: 刘继红





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Telephone: +1-925-223-8242
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<https://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

