

CiRS-7/P13K/AKT 轴对乳腺癌细胞生物学行为的影响及紫草素干预机制研究

李璐璐¹, 李 敏², 轩小燕²

(1. 黄河科技学院附属医院, 河南 郑州 459000;

2. 郑州大学基础医学院, 河南 郑州 450001)

摘 要: [目的] 探讨小脑变性相关蛋白 1 反义转录物(cerebellar degeneration-related protein 1 antisense, CDR1as, 又名 ciRS-7) 调控磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, P13K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 通路对乳腺癌细胞生物学行为影响及紫草素干预机制。[方法] 选取河南黄河科技学院附属医院收治的 41 例乳腺癌患者癌组织及癌旁正常乳腺组织, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 ciRS-7、P13K 及 AKT 信使 RNA(messenger RNA, mRNA)表达情况。选取乳腺癌细胞株 MCF-7 及正常乳腺细胞 MCF-10A 进行体外实验。采用 RT-PCR 法检测 MCF-7 和 MCF-10A 细胞 ciRS-7、P13K 及 AKT mRNA 表达水平。向 MCF-7 细胞株转染 ciRS-7 抑制剂(转染组)和 ciRS-7 inhibitor 阴性对照(阴性对照组)48 h 后, 采用 Western blot 法检测细胞 P13K、磷酸化 P13K (phosphorylation- phosphatidylinositol-3 kinase, p-P13K)、AKT、磷酸化 AKT(phosphorylation- protein kinase B, p-AKT) 蛋白表达量, MTT 法检测细胞增殖抑制率, 流式细胞术检测细胞凋亡, Transwell 小室体外侵袭和迁徙实验检测细胞的体外迁移及侵袭能力。采用不同浓度(0、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$)紫草素对 MCF-7 细胞进行干预, 48 h 后检测细胞增殖抑制率及凋亡率, RT-PCR 法检测 ciRS-7、P13K 及 AKT mRNA 表达, Western blot 法检测细胞 P13K、p-P13K、AKT、p-AKT 蛋白表达量。[结果] 相较于癌旁组织和 MCF-10A 细胞, 乳腺癌组织和 MCF-7 细胞 ciRS-7、P13K 及 AKT mRNA 水平更高($P<0.05$)。MCF-7 细胞转染后, 相较于阴性对照组, 转染组 P13K、p-P13K、AKT 和 p-AKT 蛋白相对表达量有所降低, 且细胞迁徙及侵袭能力均降低; 转染 48 h 后, 转染组和阴性对照组增殖抑制率分别为 $36.71\% \pm 4.22\%$ 、 $0.09\% \pm 0.05\%$, 两组凋亡率分别为 $27.84\% \pm 3.57\%$ 、 $5.44\% \pm 1.28\%$, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。随着紫草素干预浓度的增加, 48 h 细胞增殖抑制率及凋亡率也有所上升, ciRS-7、P13K 及 AKT mRNA 水平以及 P13K、p-P13K、AKT、p-AKT 蛋白相对表达量有所降低($P<0.05$)。[结论] ciRS-7 可通过 P13K/AKT 通路对乳腺癌细胞生物学行为产生影响, 紫草素抑制乳腺癌细胞的增殖, 并促进其凋亡, 其机制可能与 ciRS-7/P13K/AKT 通路有关。

关键词: 乳腺癌; 紫草素; ciRS-7; P13K/AKT 通路

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2021)07-0549-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.07.B007

Effect of Cirs-7 Regulation of P13K/AKT Pathway on the Biological Behavior of Breast Cancer Cells and the Mechanism of Shikonin Intervention

LI Lu-lu¹, LI Min², XUAN Xiao-yan²

(1. Huanghe S&T College Affiliated Hospital, Zhengzhou 459000, China;

2. School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of ciRS-7 regulation of P13K/AKT pathway on the biological behavior of breast cancer cells and the mechanism of shikonin intervention. [Methods] The 41 breast cancer patients admitted to our hospital were selected as the research objects. The cancer tissue and normal breast tissue adjacent to the cancer were collected, and the expression of ciRS-7, P13K and AKT mRNA was detected by RT-PCR. Select breast cancer cell line MCF-7 and normal breast cell MCF-10A for in vitro experiments. RT-PCR was used to detect the expression levels of ciRS-7, P13K and AKT mRNA in MCF-7 and MCF-10A cells. After transfecting the MCF-7 cell line with ciRS-7 inhibitor (transfection group) and ciRS-7 inhibitor negative control (negative control group) for 48 hours, Western blot was used to detect P13K, p-P13K, AKT and p-AKT proteins expression level, MTT method to detect cell proliferation inhibition rate, flow cytometry to detect cell apoptosis, Transwell chamber in vitro invasion and migration test to detect cell migration and invasion ability in vitro. Different concentrations(0, 4, 8, 16 $\mu\text{mol/L}$) of shikonin were used to intervene in MCF-7 cells. After 48 hours, the cell proliferation inhibition rate and apoptosis rate were detected. The RT-PCR method was

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(15A310002); 河南省高等学校重点科研项目(14A310014)

通信作者: 轩小燕, 副教授, 博士; 郑州大学基础医学院, 河南省郑州市科学大道 100 号(450001);

E-mail: xxy@zzu.edu.cn

收稿日期: 2020-11-13; **修回日期:** 2021-02-24

used to detect ciRS-7, P13K and AKT mRNA Expression, Western blot method to detect cell P13K, p-P13K, AKT, p-AKT protein expression. [Results] Compared with adjacent tissues and MCF-10A cells, the levels of ciRS-7, P13K and AKT mRNA in breast cancer tissues and MCF-7 cells were higher ($P < 0.05$). After transfection of MCF-7 cells, compared with the negative control group, the relative expression of P13K, p-P13K, AKT and p-AKT protein in the transfection group decreased, and the cell migration and invasion abilities were reduced. After transfection 48 hours, the proliferation inhibition rates of the transfection group and the negative control group were $36.71\% \pm 4.22\%$ and $0.09\% \pm 0.05\%$, respectively. The apoptosis rates of the two groups were $27.84\% \pm 3.57\%$ and $5.44\% \pm 1.28\%$, respectively. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). With the increase of shikonin intervention concentration, the 48 h cell proliferation inhibition rate and apoptosis rate also increased, ciRS-7, P13K and AKT mRNA levels and the relative expression of P13K, p-P13K, AKT, and p-AKT proteins decrease ($P < 0.05$). [Conclusion] ciRS-7 can affect the biological behavior of breast cancer cells through the P13K/AKT pathway. Shikonin inhibits the proliferation of breast cancer cells and promotes their apoptosis. The mechanism may be related to the ciRS-7/P13K/AKT pathway.

Subject words: breast cancer; shikonin; ciRS-7; P13K/AKT pathway

环状 RNA (circular RNAs, ciRS) 是一类非编码 RNA, 其可通过竞争性结合 miRNA 位点, 从而影响 miRNA 及其下游靶基因的表达式^[1]。小脑变性相关蛋白 1 反义转录物 (cerebellar degeneration-related protein 1 antisense, CDR1as), 又名 ciRS-7, 是首个被发现具有调控功能的环状 RNA, 并被研究证实与肿瘤的发生发展密切相关。磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, P13K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 通路参与多种肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡等过程, 并在实体瘤中广泛激活^[2-3]。紫草素为紫草干燥后的主要成分, 具有抗病毒、抗炎、抗菌以及抗肿瘤的作用。已有研究证实, 紫草素对结肠癌、肝癌等实体瘤具有较好的抗癌效果, 但其具体机制尚不明确^[4-5]。本研究探讨紫草素对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响, 并探讨其可能机制, 从而为临床上治疗乳腺癌提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2018 年 1 月至 2019 年 1 月河南黄河科技学院附属医院收治的 41 例乳腺癌患者癌组织及癌旁正常乳腺组织。所有患者均为女性, 平均年龄为 (44.5 ± 7.2) 岁。组织分级: I 级 9 例, II 级 25 例, III 级 7 例。其中浸润性小叶癌 19 例, 浸润性导管癌 16 例, 髓样癌 4 例, 浸润性微乳头状癌 2 例。淋巴结转移 26 例, 无淋巴结转移 15 例。所有研究对象及其家属对本研究知情同意, 研究通过医院伦理委员

会批准。

乳腺癌细胞株 MCF-7 及正常乳腺细胞 MCF-10A 均购于中国科学院上海生科院细胞资源中心细胞库。

1.2 主要实验试剂与仪器

紫草素 (中国药品生物制品鉴定所); Takara 两步法 RT-PCR 试剂盒 (日本 Takara 公司); Sybr RT-PCR 试剂盒 (杭州博日科技有限公司); 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Genview 公司); P13K、p-P13K、AKT、p-AKT 鼠多克隆抗体、鼠抗 β -actin (英国 Abcam 公司); ECL 高效化学发光试剂盒 (美国 Genview 公司); ECL 高效化学发光试剂盒 (美国 Genview 公司); ciRS-7 和 ciRS-7 抑制阴性对照 (Ambion, USA); ciRS-7、P13K、AKT、U6 及 GADPH 引物由北京鼎国生物科技有限公司设计和合成, 引物序列见表 1 (Table 1)。

仪器: 光学显微镜 (奥林巴斯 BX53, 日本奥林巴斯); Real-time PCR 仪 (MX3000P, 美国 Gene 公司); Bio Rad 450 酶标仪 (美国 Bio Rad 公司); JY-SCZ2

Table 1 Primer sequences

Primer	Sequence
ciRS-7 upstream	5'-ACGTCTCCAGTGTGCTGA-3'
ciRS-7 downstream	5'-CTTGACACAGGTGCCATC-3'
P13K upstream	5'-ATCGATCGATCGTAGCTAGCTCGA-3'
P13K downstream	5'-CGTACGTAGCTAGCTAGCTAGCTG-3'
AKT upstream	5'-GTAGCTACTAGCTATCAGTCATCGT-3'
AKT downstream	5'-CGTAGCTAGCTAGCTAGCTGATCGC-3'
U6 upstream	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
U6 downstream	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
GADPH upstream	5'-TGTGGGCATCAATGCGATTGG-3'
GADPH downstream	5'-ACACCATGTATTCCGGGTCAAT-3'

型 SDS-PAGE 蛋白电泳仪(北京六一仪器厂);FACS 流式细胞仪(美国 BD 公司);Transwell 小室(美国 Corning Costar Corp 公司)。

1.3 方法

1.3.1 乳腺癌组织及癌旁组织 ciRS-7、P13K 和 AKT mRNA 水平检测

采用 RNA 提取试剂盒提取癌组织及癌旁正常乳腺组织 RNA,反转录后根据 Sybr RT-PCR 试剂盒说明书进行 RT-PCR 实验。反应体系为:95℃预变性 30 s,变性 95℃ 5 s,退火 60℃ 30 s,循环 35 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来测定各组 ciRS-7、P13K、AKT 基因相对表达量,ciRS-7 内参为 U6,P13K、AKT 内参为 GADPH,每个样本重复 3 次,取平均值。

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式: $2^{-\Delta\Delta C_t}=2^{-(\Delta C_t \text{ 目标基因}-\Delta C_t \text{ GADPH})}$

1.3.2 细胞培养

在六孔板中培养 MCF-7 及 MCF-10A 细胞,培养基为完全培养基,培养条件为 37℃,5%CO₂,细胞单层贴壁培养,待细胞长满至 80%时,传代培养。取对数生长期细胞用于后续实验。

1.3.3 RT-PCR 法

取对数生长期细胞,采用 RT-PCT 法检测 MCF-7 及 MCF-10A 细胞 ciRS-7、P13K、AKT 基因相对表达量,方法同 1.3.1。

1.3.4 转染 MCF-7 细胞株

采用 Lipofectamine 3000 试剂将 ciRS-7 抑制剂转染 MCF-7 细胞株(转染组),并设立 ciRS-7 抑制阴性对照(阴性对照组),转染 48 h 后进行后续实验。

1.3.5 Western blot 法

转染 48 h 后,采用蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白并测定浓度。根据 Western blot 试剂盒说明书进行电泳、转膜、封闭,加入稀释后的鼠抗(P13K、p-P13K、AKT、p-AKT 及 β -actin)孵育过夜。次日 TBST 洗涤后,加入 HRP 标记的山羊抗鼠二抗,孵育 2 h 后进行成像,并采用 Image J 软件进行灰度值分析,计算蛋白相对表达量,重复 3 次。

蛋白相对表达量=目标蛋白灰度值/ β -actin 蛋白灰度值。

1.3.6 细胞增殖抑制率检测

取对数生长期 MCF-7 细胞以 $2.5 \times 10^5/\text{ml}$ 浓度接种于 96 孔板中,每孔 199 μl ,共 6 组。于培养箱培养 24h 后,设置转染组和阴性对照组,进行转染,

转染后培养 48 h 进行 MTT 实验,490 nm 处采用酶联免疫检测仪检测各孔的吸光度(OD)值。细胞增殖抑制率=1-(加药组 OD 值-调零孔 OD 值)/(对照 OD 值-调零孔 OD 值) $\times 100\%$,重复 3 次。

1.3.7 细胞凋亡率检测

转染同 1.3.4。转染后培养 48 h,胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤后,通过流式细胞仪检测凋亡率。

1.3.8 细胞迁徙、侵袭情况检测

转染同 1.3.4,转染 48 h 后采用 Transwell 法进行 MCF-7 细胞侵袭实验。Transwell 小室风干后,加入 500 μl 0.1%结晶紫染色,显微镜下计数发生迁移的细胞数量,计算迁移抑制率,迁徙抑制率=(阴性对照组迁徙细胞数-转染组迁徙细胞数)/阴性对照组迁徙细胞数 $\times 100\%$ 。细胞侵袭实验在 Transwell 小室上层加入 50 μl 2.0 mg/ml 基质胶 Matrigel,凝固后接种 LOVO 细胞,之后操作同细胞迁移,计算侵袭抑制率。侵袭抑制率=(阴性对照组侵袭细胞数-转染组侵袭细胞数)/阴性对照组侵袭细胞数 $\times 100\%$ 。倒置显微镜下随机选取 5 个视野进行细胞的计数,重复 3 次。

1.3.9 不同浓度紫草素干预及指标检测

细胞培养同 1.3.2。待细胞处于对数生长期时,加入不同浓度的紫草素,使各孔紫草素浓度分别为 0、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 。每孔设置 3 个复孔。干预 48 h 后进行检测。RT-PCR 检测 ciRS-7、P13K、AKT mRNA 同 1.3.1,Western blot 法检测 P13K、p-P13K、AKT、p-AKT 蛋白量同 1.3.3,细胞增殖抑制率检测同 1.3.4,细胞凋亡率检测同 1.3.5。

1.4 统计学处理

采用 SPSS22.0 进行数据分析,计量数据采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间各指标的比较采用单因素方差分析,组间两两比较,若方差齐采用 LSD-*t* 检验,若方差不齐采用 Dunnett-*t* 检验,计数资料的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织及正常乳腺组织 ciRS-7、P13K 和 AKT mRNA 表达水平

癌组织 ciRS-7、P13K 和 AKT mRNA 相对水平分别为 1.394 ± 0.452 、 0.947 ± 0.155 、 0.813 ± 0.128 ;癌旁

正常乳腺组织 ciRS-7、P13K、AKT mRNA 相对水平分别为 0.498 ± 0.221 、 0.286 ± 0.058 、 0.249 ± 0.046 ，两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (Figure 1)。

2.2 MCF-7 及 MCF-10A 细胞 ciRS-7、P13K 和 AKT mRNA 表达水平

MCF-7 细胞及 MCF-10A 细胞 ciRS-7、P13K 和 AKT mRNA 相对水平分别为 0.921 ± 0.186 、 0.748 ± 0.128 、 0.712 ± 0.139 ； 0.322 ± 0.058 、 0.223 ± 0.064 、 0.245 ± 0.071 ，两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (Figure 2)。

2.3 转染后 MCF-7 细胞 P13K、p-P13K、AKT、p-AKT 蛋白水平

转染后，转染组 P13K、p-P13K、AKT、p-AKT 蛋白相对水平为 0.221 ± 0.067 、 0.128 ± 0.044 、 0.228 ± 0.054 、 0.158 ± 0.052 ；阴性对照组 P13K、p-P13K、AKT、p-AKT 蛋白相对水平为 0.682 ± 0.109 、 0.533 ± 0.121 、 0.493 ± 0.103 、 0.399 ± 0.073 ，两组比较差异具有统计

学意义 ($P < 0.05$) (Figure 3、4)。

2.4 转染后 MCF-7 细胞增殖抑制率和凋亡率

转染 48 h 后转染组和阴性对照组增殖抑制率分别为 $36.71\% \pm 4.22\%$ 和 $0.09\% \pm 0.05\%$ ，差异有统计学意义 ($t = 15.029$, $P < 0.001$)；两组凋亡率分别为 $27.84\% \pm 3.57\%$ 和 $5.44\% \pm 1.28\%$ ，差异有统计学意义 ($t = 10.230$, $P < 0.001$) (Figure 5)。

2.5 转染后 MCF-7 细胞迁徙、侵袭能力

转染后，阴性对照组迁徙细胞数及侵袭细胞数分别为 (71.27 ± 9.63) 个、 (51.44 ± 9.23) 个；转染组迁徙细胞数及侵袭细胞数为 (39.22 ± 4.41) 个、 (24.34 ± 6.44) 个，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，转染组细胞迁徙抑制率及侵袭抑制率分别为 45.10% 和 52.90% (Table 2, Figure 6)。

2.6 紫草素干预后细胞增殖抑制率及凋亡率

紫草素干预 48 h 后，0、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞

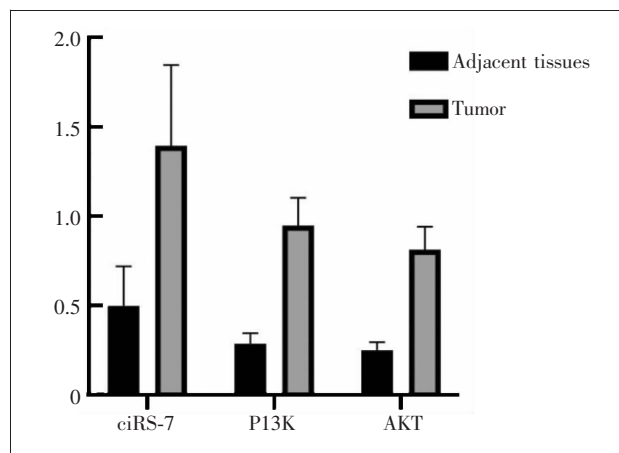


Figure 1 Relative expression levels of ciRS-7, P13K and AKT mRNA in cancer tissue and normal breast tissue

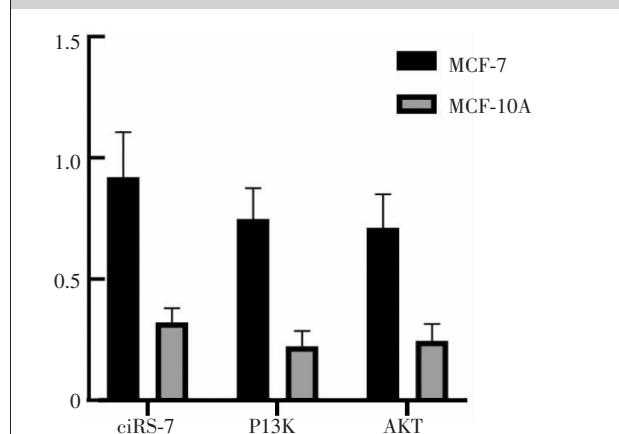


Figure 2 Relative expression levels of ciRS-7, P13K and AKT mRNA in MCF-7 and MCF-10A cells

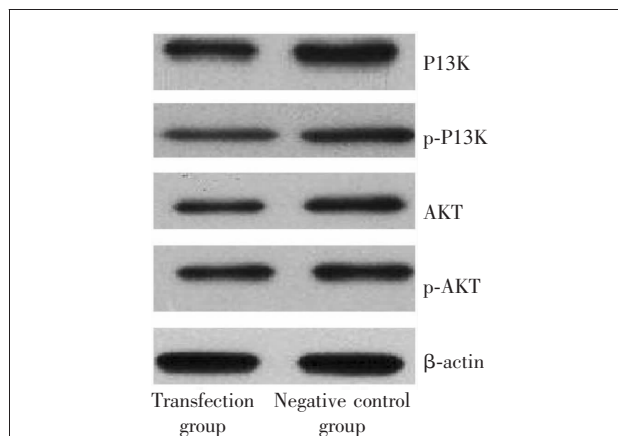


Figure 3 Western blot results of P13K, p-P13K, AKT, and p-AKT proteins in MCF-7 cells after transfection

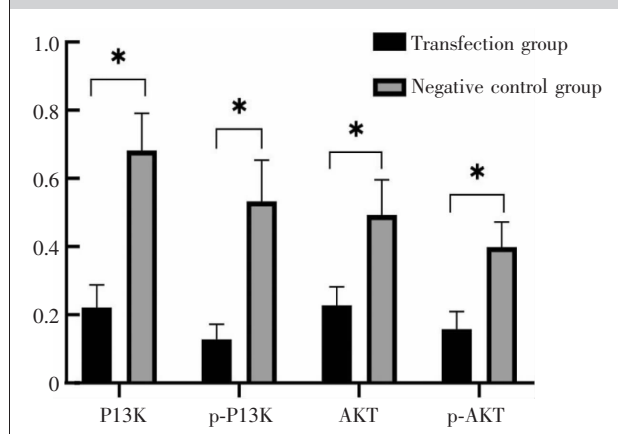


Figure 4 Relative expression levels of P13K, p-P13K, AKT and p-AKT proteins in MCF-7 cells

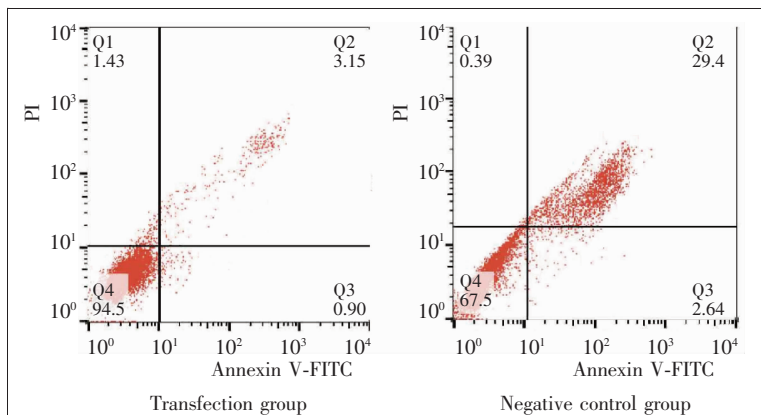


Figure 5 Flow cytometry results of MCF-7 cells after transfection

Table 2 Migration and invasion ability of MCF-7 cells after transfection

Group	Migratory cell number	Migration inhibition rate (%)	Invading cell number	Invasion inhibition rate (%)
Transfection group	39.22±4.41	45.10	24.34±6.44	52.90
Negative control group	71.27±9.63	—	51.44±9.23	—
<i>t</i>	5.241		4.171	
<i>P</i>	0.006		0.014	

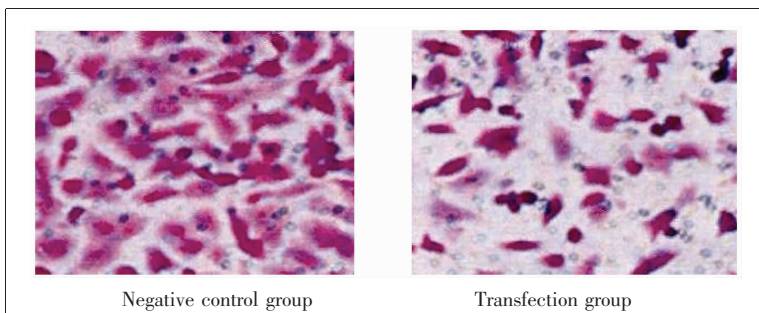


Figure 6 MCF-7 cell invasion after transfection (×100)

Table 3 Cell proliferation inhibition rate and apoptosis rate after shikonin intervention

Shikonin concentration	Proliferation inhibition rate (%)	Apoptosis rate (%)
0 μmol/L	4.98±1.22	4.42±1.17
4 μmol/L	22.34±3.01 ^a	19.15±2.44 ^a
8 μmol/L	34.05±3.58 ^{ab}	33.21±3.94 ^{ab}
16 μmol/L	41.49±5.22 ^{abc}	42.98±5.51 ^{abc}
<i>F</i>	60.036	63.784
<i>P</i>	<0.001	<0.001

Note: a: compared with 0 μmol/L group, *P*<0.05; b: compared with 4 μmol/L group, *P*<0.05; c: compared with 8 μmol/L group, *P*<0.05

增殖抑制率分别为 4.98%±1.22%、22.34%±3.01%、34.05%±3.58%、41.49%±5.22%，随着浓度上升，细胞增殖抑制率也有所上升 (*F*=60.036, *P*<0.001); 0、4、8、16 μmol/L 组细胞凋亡率分别为 4.42%±1.17%、

19.15%±2.44%、33.21%±3.94%、42.98%±5.51%，随着浓度上升，细胞凋亡率也有所上升 (*F*=63.784, *P*<0.001) (Table 3, Figure 7)。

2.7 紫草素干预后 MCF-7 细胞 ciRS-7、P13K 和 AKT mRNA 表达水平

紫草素干预后, 0、4、8、16 μmol/L 组 ciRS-7、P13K 及 AKT mRNA 相对水平随浓度上升而有所下降 (*P* 均<0.05) (Table 4)。

2.8 紫草素干预后 MCF-7 细胞 P13K、p-P13K、AKT 和 p-AKT 蛋白表达水平

紫草素干预后, 0、4、8、16 μmol/L 组细胞 P13K、p-P13K、AKT、p-AKT 蛋白相对表达水平也有所下降 (*P* 均<0.05) (Table 5, Figure 8)。

3 讨论

ciRS-7 为最早被确认具有 miRNA 海绵作用的环状 RNA，其在多种实体瘤中均呈异常表达^[6-8]。本研究结果显示，在乳腺癌组织或乳腺癌细胞中，ciRS-7 表达水平均有所增加，而通过抑制乳腺癌细胞 ciRS-7 的表达后，细胞增殖能力显著性下降，而凋亡率则有所上升，提示 ciRS-7 可能促进乳腺癌细胞 (MCF-7) 的增殖活性。在肿瘤患者中，肿瘤细胞通过迁徙及侵袭而发生远端或局部转移，这也是导致晚期患者死亡的主要原因之一。研究通过 Transwell 小室体外侵袭和迁徙实验检测细胞的体外迁徙及侵袭能力，结果显示，在沉默 ciRS-7 的表达后，细胞的迁徙及侵袭能力均有所下降，提示 ciRS-7 可能会影响乳腺癌细胞 (MCF-7) 迁徙以及侵袭的能力。因此，ciRS-7 可能会对乳腺癌细胞 (MCF-7) 生物学行为产生一定影响。

研究报道，ciRS-7 可作为 miR-7 的分子海绵通过影响其下游 P13K/AKT 信号通路参与肿瘤细胞的发生发展^[7]。在外在因素的作用下，P13K/AKT 信号通路被激活，进而诱导癌细胞的增殖、分化，并抑制其凋亡^[9-10]。AKT 为 P13K/AKT 信号通路的下游靶蛋白，其在调控肿瘤细胞生物学行为中起着重要作用。因此，通过调节 AKT 的表达可维持细胞增殖与

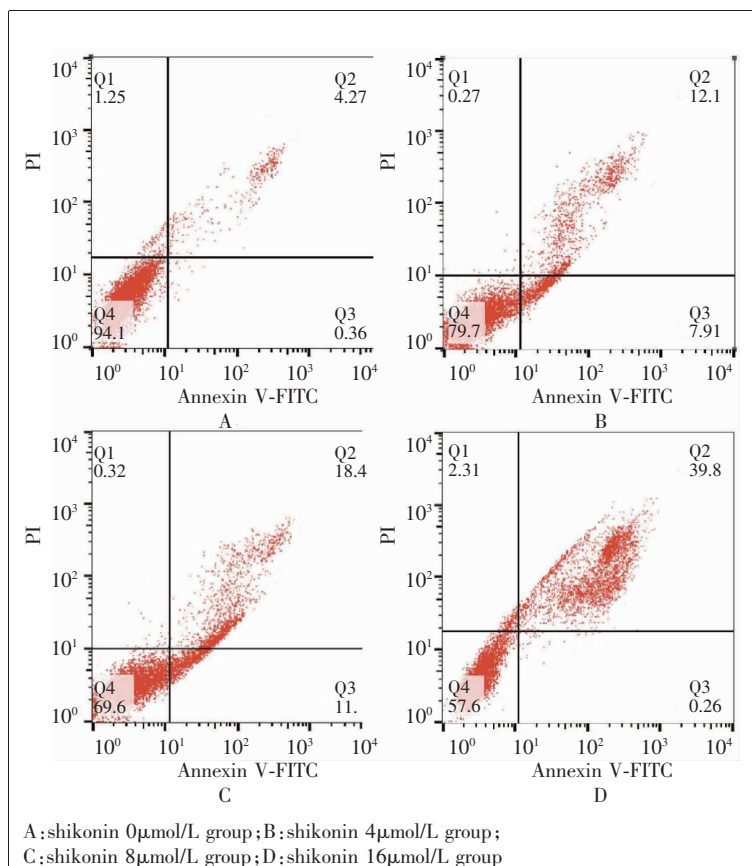


Figure 7 Cell flow cytometry results after Shikonin intervention

Table 4 The relative expression levels of ciRS-7, P13K and AKT mRNA in MCF-7 cells after shikonin intervention

Shikonin concentration	ciRS-7	P13K	AKT
0 μmol/L	0.921±0.186	0.813±0.147	0.894±0.137
4 μmol/L	0.548±0.081 ^a	0.602±0.095 ^a	0.622±0.056 ^a
8 μmol/L	0.389±0.044 ^{ab}	0.447±0.082 ^{ab}	0.458±0.064 ^{ab}
16 μmol/L	0.228±0.016 ^{abc}	0.195±0.044 ^{abc}	0.241±0.083 ^{abc}
F	24.361	20.705	27.657
P	<0.001	<0.001	<0.001

Note: a: compared with 0 μmol/L group, $P<0.05$; b: compared with 4 μmol/L group, $P<0.05$; c: compared with 8 μmol/L group, $P<0.05$

Table 5 Relative expression levels of P13K, p-P13K, AKT and p-AKT proteins in MCF-7 cells after shikonin intervention

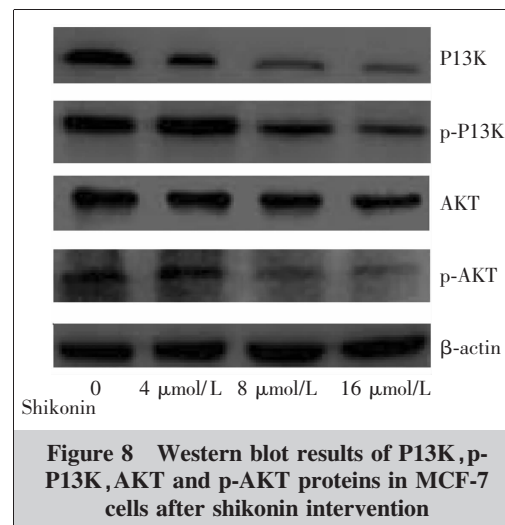
Shikonin concentration	P13K	p-P13K	AKT	p-AKT
0 μmol/L	0.713±0.112	0.592±0.128	0.617±0.112	0.538±0.095
4 μmol/L	0.524±0.067 ^a	0.433±0.047 ^a	0.427±0.035 ^a	0.332±0.027 ^a
8 μmol/L	0.299±0.047 ^{ab}	0.242±0.053 ^{ab}	0.301±0.039 ^{ab}	0.225±0.030 ^{ab}
16 μmol/L	0.184±0.058 ^{abc}	0.124±0.041 ^{abc}	0.198±0.037 ^{abc}	0.112±0.048 ^{abc}
F	29.479	22.211	23.772	29.296
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: a: compared with 0 μmol/L group, $P<0.05$; b: compared with 4 μmol/L group, $P<0.05$; c: compared with 8 μmol/L group, $P<0.05$

凋亡的平衡,从而达到抑制肿瘤细胞增长的目的。本研究结果显示,在乳腺癌组织或乳腺癌细胞中,P13K及AKT mRNA均呈过表达,而通过沉默ciRS-7表达后,P13K、AKT及其磷酸化蛋白的表达均受到一定抑制。研究提示ciRS-7可能通过P13K/AKT信号通路参与肿瘤细胞的生长。

紫草素是从天然紫草中提取出的有效活性成分。研究表明,紫草素可干预肿瘤细胞的生长周期,并对其凋亡具有促进作用^[11-12]。研究证实,通过一定浓度的紫草素干预后,乳腺癌细胞的体外活动能力明显被抑制^[13]。有研究发现,紫草素可通过抑制P13K/AKT信号通路从而对肿瘤细胞的活力产生影响^[14]。国外一项研究报告,紫草素可对乳腺癌细胞的生长周期产生阻滞作用,并诱导双特异性磷酸酶的表达,进而促进乳腺癌细胞的死亡^[15]。本研究结果显示,通过对乳腺癌细胞(MCF-7)进行紫草素干预,随着干预浓度的增加,细胞增殖抑制率及凋亡率均有所上升,说明紫草素可对乳腺癌细胞的增殖产生抑制作用,并促进其凋亡。研究进一步发现,通过干预,细胞ciRS-7及P13K/AKT信号通路的表达均受到一定抑制,并呈剂量效应关系,提示紫草素干预机制可能与ciRS-7/P13K/AKT通路有关。

综上所述,ciRS-7可通过P13K/AKT通路对乳腺癌细胞生物学行为产生影响,



紫草素抑制乳腺癌细胞的增殖,并促进其凋亡,其机制可能与 ciRS-7/PI3K/AKT 通路有关。

参考文献:

- [1] Li RC,Ke S,Meng FK,et al. CiRS-7 promotes growth and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma via regulation of miR-7/HOXB13[J]. Cell Death Dis,2018,9(8):838.
- [2] 张杜平,崔振鹏,刘鹤,等. 盐酸坦索罗辛对前列腺增生大鼠 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. 广西医科大学学报,2020,37(5):850-855.
Zhang DP,Cui ZP,Liu H,et al. Effect of tamsulosin hydrochloride on the PI3K/Akt signaling pathway in benign prostatic hyperplasia rats[J]. Journal of Guangxi Medical University,2020,37(5):850-855.
- [3] 马西,杜鹏程,宁登,等. IL-13、COX2 和 PI3 K/Akt 信号通路 with 结肠癌侵袭转移的关系[J]. 广东医学,2020,41(16):1637-1641.
Ma X,Du PC,Ning D,et al. The correlation between IL-13,COX2 and PI3K/Akt signaling pathway and the invasion and metastasis of colon cancer [J]. Guangdong Medical Journal,2020,41(16):1637-1641.
- [4] 邓必勇,邓必祥. 天然紫草素衍生物 SYUNZ-7 对肿瘤的作用效果及机制[J]. 中国老年学杂志,2020,40(1):168-171.
Deng BY,Deng BX. The effect and mechanism of natural shikonin derivative SYUNZ-7 on tumor[J]. Chinese Journal of Gerontology,2020,40(1):168-171.
- [5] 陈静,候尧,伍春莲. 紫草素及其衍生物抗妇科肿瘤作用研究进展[J]. 中草药,2020,51(14):3814-3820.
Chen J,Hou Y,Wu CL. Research progress of anti-gynecological tumors effect of shikonin and its derivatives[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2020,51(14):3814-3820.
- [6] Zheng XB,Zhang M,Xu MQ. Detection and characterization of ciRS-7:a potential promoter of the development of cancer[J]. Neoplasma,2017,64(3):321-328.
- [7] Pan H,Tao L,Jiang Y,et al. Overexpression of circular RNA ciRS-7 abrogates the tumor suppressive effect of mir-7 on gastric cancer via PTEN / PI3K / AKT signaling pathway[J]. J Cell Biochem,2018,119(1): 440-446.
- [8] Li R,Ke S,Meng F,et al. CiRS-7 promotes growth and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma via regulation of miR-7 / HOXB13[J]. Cell Death Dis,2018,9(8):838-851.
- [9] Dey JH,Bianchi F,Voshol J,et al. Targeting fibroblast growth factor receptors blocks PI3K / AKT signaling,induces apoptosis,and impairs mammary tumor outgrowth and metastasis[J]. Cancer Res,2016,70(10):4151-4162.
- [10] Bugide S,Gonugunta VK,Penugurti V,et al. HPIP promotes epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in ovarian cancer cells through PI3K/AKT pathway activation[J]. Cell Oncol,2017,40(2):1-12.
- [11] 马艳华,黄芬,王文尖. 紫草素对 HepG2 细胞增殖、凋亡和 PI3K/Akt/NF-κB 信号通路蛋白表达的影响 [J]. 实用肝脏病杂志,2020,23(4):471-475.
Ma YH,Huang F,Wang WJ. Effects of shikonin on proliferation,apoptosis and PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway protein expression in HepG2 cells in vitro [J]. Journal of Practical Hepatology,2020,23(4):471-475.
- [12] 苏龙,张云蔚,王卓. 紫草素对人白血病 MV4-11 细胞的增殖抑制和促凋亡作用 [J]. 吉林大学学报 (医学版),2020,46(1):96-101.
Su L,Zhang YW,Wang Z. Proliferation inhibition and pro-apoptotic effects of shikonin on human leukemia MV4-11 cells[J]. Journal of Jilin University(Medicine Edition),2020,46(1):96-101.
- [13] 杨阳,高文雅,陶仕英,等. 紫草素抗雌激素对人乳腺癌 MCF-7 细胞周期蛋白 D1 表达的影响[J]. 医学研究杂志,2020,49(2):28-32.
Yang Y,Gao WY,Tao SY,et al. Effects of shikonin against estrogen on the expression of Cyclin D1 of MCF-7 Cells in human breast cancer[J]. Journal of Medical Research,2020,49(2):28-32.
- [14] 陈菊英,刘朝纯,曾智,等. 紫草素通过 PI3K/Akt 通路促进人乳腺癌 MCF-7 细胞自噬 [J]. 中国药理学通报,2013,29(2):194-198.
Chen JY,Liu CC,Zeng Z,et al. Shikonin promotes autophagy of MCF-7 human breast cancer cells through PI3K/Akt pathway [J]. Chinese Pharmacological Bulletin,2013,29(2):194-198.
- [15] Jang SY, Lee JK, Jang EH, et al. Shikonin blocks migration and invasion of human breast cancer cells through inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation[J]. Oncol Rep,2014,31(6):2827-2833.