

# 苍耳亭通过调控 LOXL1-AS1/miR-520d-5p 轴 对白血病细胞增殖和凋亡的影响\*

王丹丹 饶琦 郭彩玲 赵寅 史岑敏

(四川大学华西医院血液内科, 四川 成都 610041)

**【摘要】** 目的 探讨苍耳亭对白血病细胞的抗癌作用及其机制是否与调控长链非编码 RNA(lncRNA)类赖氨酰氧化酶 1 反义 RNA1(LOXL1-AS1)和微小 RNA(miR)-520d-5p 表达有关。方法 按转染细胞分组:对照组、苍耳亭 6  $\mu\text{mol/L}$ 组、苍耳亭 20  $\mu\text{mol/L}$ 组、苍耳亭 60  $\mu\text{mol/L}$ 组、si-NC 组、si-LOXL1-AS1 组、苍耳亭+pcDNA-LOXL1-AS1 组;采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法、流式细胞术检测细胞增殖和凋亡。实时定量 PCR(RT-qPCR)检测 LOXL1-AS1 和 miR-520d-5p 表达;蛋白质印迹法检测 B 细胞淋巴瘤(Bcl)-2 和 Bcl 相关 x 蛋白(Bax)蛋白表达。分别转染 LOXL1-AS1 小干扰 RNA、LOXL1-AS1 过表达载体至 K-562 细胞中,通过 CCK-8 法、流式细胞术、蛋白质印迹法分析干扰 LOXL1-AS1 表达或过表达 LOXL1-AS1 联合苍耳亭对 K-562 细胞增殖、凋亡以及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响。双荧光素酶报告实验分析 LOXL1-AS1 和 miR-520d-5p 相互作用。**结果** 苍耳亭处理后 K-562 细胞增殖抑制率、凋亡率、Bax 蛋白表达、miR-520d-5p 表达显著升高(均  $P<0.05$ ),Bcl-2 蛋白表达、LOXL1-AS1 表达显著降低(均  $P<0.05$ )。干扰 LOXL1-AS1 表达后 K-562 细胞增殖抑制率、凋亡率、Bax 蛋白表达、miR-520d-5p 表达显著升高(均  $P<0.05$ ),Bcl-2 蛋白表达显著降低( $P<0.05$ )。过表达 LOXL1-AS1 明显减弱苍耳亭处理对 K-562 细胞增殖、凋亡以及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响。LOXL1-AS1 与 miR-520d-5p 直接结合。**结论** 苍耳亭可抑制白血病细胞增殖,诱导其凋亡,其机制可能与抑制 LOXL1-AS1/miR-520d-5p 轴有关。

**【关键词】** 苍耳亭;白血病;细胞增殖;凋亡;LOXL1-AS1;miR-520d-5p

**【中图分类号】** R733.7 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 07. 003

## Effect of Xanthatin on the proliferation and apoptosis of leukemia cells by regulating the LOXL1-AS1/miR-520d-5p axis

WANG Dandan, RAO Qi, GUO Cailing, ZHAO Yin, SHI Cenmin

(Department of Hematology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the anti-cancer effect of Xanthatin on leukemia cells, and further to explore whether its mechanism is related to the regulation of long non-coding RNA(lncRNA) lysyl oxidase 1 antisense RNA1(LOXL1-AS1) and microRNA(MiR)-520d-5p expression. **Methods** Experimental groups: control group, Xanthatin 6  $\mu\text{mol/L}$  group, Xanthatin 20  $\mu\text{mol/L}$  group, Xanthatin 60  $\mu\text{mol/L}$  group, si-NC group, si-LOXL1-AS1 group, and Xanthatin+pcDNA-LOXL1-AS1 group. Cell proliferation and apoptosis were detected by cell counting kit(CCK-8) method and flow cytometry. LOXL1-AS1 and miR-520d-5p expression was calculated using real-time quantitative PCR(RT-qPCR); Expression of B-cell lymphoma(Bcl)-2 and Bcl-related x protein(Bax) proteins were analyzed by Western blotting. The LOXL1-AS1 small interfering RNA and LOXL1-AS1 overexpression vector were respectively transfected into K-562 cells, and the effect of Xanthatin on cell proliferation, apoptosis, and expression of Bcl-2 and Bax proteins were detected using CCK-8, flow cytometry and Western blotting. The interaction between LOXL1-AS1 and miR-520d-5p was confirmed using dual luciferase reporter experiment. **Results** The cell proliferation inhibition rate, apoptosis rate, Bax protein expression, miR-520d-5p expression of K-562 cells were notably increased after Xanthatin treatment ( $P<0.05$ ),

基金项目:四川省中医药管理局科学技术研究项目(2020JC0122)

引用本文:王丹丹,饶琦,郭彩玲,等.苍耳亭通过调控 LOXL1-AS1/miR-520d-5p 轴对白血病细胞增殖和凋亡的影响[J].西部医学,2022,34(7):

948-953. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 07. 003

while Bcl-2 protein expression and LOXL1-AS1 expression were notably decreased ( $P < 0.05$ ). After interference with LOXL1-AS1 expression, the cell proliferation inhibition rate, apoptosis rate, Bax protein expression, miR-520d-5p expression of K-562 cells were notably increased ( $P < 0.05$ ), while Bcl-2 protein expression was notably decreased ( $P < 0.05$ ). LOXL1-AS1 overexpression notably attenuated the effects of Xanthatin on K-562 cell proliferation, apoptosis and the expression of Bcl-2 and Bax proteins. LOXL1-AS1 directly bound to miR-520d-5p. **Conclusion** Xanthatin inhibits the proliferation and induce apoptosis of leukemia cells, the mechanism may be associated with the inhibition of LOXL1-AS1/miR-520d-5p axis.

**【Key words】** Xanthatin; Leukemia; Cell proliferation; Apoptosis; LOXL1-AS1; MiR-520d-5p

白血病是一种恶性克隆性造血干细胞疾病。由于白血病细胞增殖失控、凋亡受阻、分化障碍等原因,机体正常造血功能受到抑制,并导致贫血和免疫缺陷等严重症状。苍耳亭是从菊科植物苍耳 *Xanthium-sibiricum* 干燥成熟带总苞的果实中提取的天然倍半萜内酯,具有抗癌、抗血管生成、抗炎、抗寄生虫等作用<sup>[1-2]</sup>。研究报道苍耳亭对宫颈癌细胞具有明显的抑制增殖和促进凋亡作用<sup>[3]</sup>。苍耳亭通过干扰核因子 $\kappa$ B 通路诱导非小细胞肺癌细胞 G2/M 周期阻滞和凋亡<sup>[4]</sup>。然而,苍耳亭对白血病抗癌作用和机制鲜有报道。长链非编码 RNA (lncRNA) 和微小 RNA (miRNA) 是研究最多的非编码类型,其通过直接或间接地调控细胞增殖、分化、凋亡和转移等相关基因表达,具有抑癌或致癌基因功能<sup>[5-6]</sup>。lncRNA 类赖氨酰氧化酶 1 反义 RNA1 (LOXL1-AS1) 位于 15q24.1, 研究报道肺癌中 LOXL1-AS1 高表达明显增强肿瘤细胞增殖和侵袭能力<sup>[7]</sup>。干扰 LOXL1-AS1 表达明显抑制胃癌细胞增殖和转移<sup>[8]</sup>。靶基因预测显示 miR-520d-5p 是 LOXL1-AS1 的潜在靶点,有研究指出急性 T 淋巴细胞白血病患者中 miR-520d-5p 表达下调<sup>[9]</sup>。咪达唑仑通过上调 miR-520d-5p 表达诱导肺癌细胞凋亡<sup>[10]</sup>。然而,LOXL1-AS1 是否靶向 miR-520d-5p 调控白血病进展并不清楚。本研究通过分析苍耳亭对白血病细胞增殖、凋亡以及 LOXL1-AS1、miR-520d-5p 表达的影响,旨在探讨苍耳亭在白血病中潜在抗肿瘤机制。

## 1 材料与方 法

1.1 实验材料 白血病 K-562 细胞购自中国典型培养物保藏中心;RPMI-1640、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;苍耳亭(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 20200110)购自上海源叶生物;RNAiso Plus 试剂购自大连 Takara 生物公司;荧光素酶报告载体、PCR 引物、miR-520d-5p 模拟物(mimics)及其阴性对照(miR-NC)、针对 LOXL1-AS1 小干扰 RNA (si-LOXL1-AS1) 及其阴性对照 (si-NC)、LOXL1-AS1 过表达质粒 (pcDNA-LOXL1-AS1) 购自广州锐博生物公司;膜联蛋白 V-异硫氰酸

荧光素 (Annexin V-FITC) 凋亡检测试剂盒购自南京诺唯赞生物公司;细胞计数试剂盒 (CCK-8)、磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 兔单克隆抗体 (AF1186)、B 细胞淋巴瘤 (Bcl)-2 兔多克隆抗体 (AF6285)、Bcl 相关 X 蛋白 (Bax) 兔单克隆抗体 (AF1270)、山羊抗兔 IgG (A0208) 购自上海碧云天生物公司;反转录试剂盒、miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒、lnRcute lncRNA 荧光定量检测试剂盒购自北京天根生化科技公司。

## 1.2 方 法

1.2.1 细胞培养和苍耳亭浓度筛选 将 K-562 细胞培养在 RPMI-1640 培养基中,培养基中添加 10% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素,放入 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。取  $5 \times 10^3$  个第三代对数期 K-562 细胞接种 6 孔板,分别用含 0、5、15、30、60、90  $\mu$ mol/L 苍耳亭<sup>[3]</sup> 的培养液孵育 K-562 细胞 24 h,每孔 K-562 细胞中加入 10  $\mu$ L 的 CCK-8 溶液,孵育 2 h 后,分光光度计测定 450 nm 处吸光度 (OD)。增殖抑制率 (%) = (1 - 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值)  $\times 100\%$ 。根据增殖抑制率选择 6、20、60  $\mu$ mol/L 苍耳亭进行实验。

1.2.2 细胞转染和实验分组 取  $2 \times 10^5$  个对数期 K-562 细胞接种 6 孔板,当细胞密度为 50% 时利用 Lipofectamine 3000 分别转染 si-LOXL1-AS1、si-NC、pcDNA-LOXL1-AS1 至 K-562 细胞,转染 48 h 采用 RT-qPCR 检测 LOXL1-AS1 水平已验证转染效果。实验分组:对照组为正常培养的 K-562 细胞;苍耳亭 6  $\mu$ mol/L 组、苍耳亭 20  $\mu$ mol/L 组、苍耳亭 60  $\mu$ mol/L 组为分别用含 6、20、60  $\mu$ mol/L 苍耳亭的培养液孵育 K-562 细胞 24 h; si-NC 组、si-LOXL1-AS1 组为分别转染 si-NC、转染 si-LOXL1-AS1 的 K-562 细胞;苍耳亭 + pcDNA-LOXL1-AS1 组为含 60  $\mu$ mol/L 苍耳亭的培养液孵育转染 pcDNA-LOXL1-AS1 的 K-562 细胞 24 h。每组设置 3 个复孔,实验独立重复 3 次。

1.2.3 CCK-8 法检测 K-562 细胞增殖 将转染 si-LOXL1-AS1、si-NC 或者 pcDNA-LOXL1-AS1 的 K-

562 细胞、未转染 K-562 细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔密度接种 96 孔板,按照“1.2.2”实验分组加入一定浓度的苍耳亭孵育细胞 24 h,随后按 1.2.1 步骤测定各孔 OD 值,根据 OD 值计算增殖抑制率。每组设置 3 个复孔,实验独立重复 3 次。

1.2.4 流式细胞术检测 K-562 细胞凋亡率 将各组 K-562 细胞重悬于 100  $\mu$ L 的 1 $\times$ 结合缓冲液中,细胞密度为  $1 \times 10^6$  /mL。分别取 5  $\mu$ L 的 Annexin V-FITC、碘化丙啶(PI)加入到述细胞悬液中,避光孵育 15 min。补加 400  $\mu$ L 的 1 $\times$ 结合缓冲液并混合均匀。流式细胞仪检测各组 K-562 细胞凋亡情况。

1.2.5 蛋白质印记检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达 用含 1%蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液提取各组 K-562 细胞总蛋白。蛋白定量后,取 30  $\mu$ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE,设置电压 100 V,时间 90 min。然后湿转蛋白至硝酸纤维素膜上,设置电流 20 mA 过夜。用 5%脱脂乳封闭膜 2 h,4 $^{\circ}$ C 下用 Bax 抗体(1:800)、Bcl-2 抗体(1:500)、内参 GAPDH 抗体(1:2000)孵育过夜,室温下用二抗(1:1000)孵育 1 h。洗膜后,用 ECL 试剂盒检测蛋白条带。以 Image J 软件测得的 Bax(或 Bcl-2)与 GAPDH 条带灰度值比值表示 Bax(或 Bcl-2)蛋白相对表达量。每组设置 3 个复孔,实验独立重复 3 次。

1.2.6 RT-qPCR 检测 LOXL1-AS1 和 miR-520d-5p 表达 用 RNAiso Plus 试剂提取各组 K-562 细胞的总 RNA。利用逆转录试剂盒合成 cDNA,再用 miRNA、lncRNA 荧光定量检测试剂盒分别检测 LOXL1-AS1、miR-520d-5p 表达。miRNA 和 lncRNA 的相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。LOXL1-AS1:上游 5'-GATATGTTGGATGGATGA-3',下游 5'-GATATGTTGGATGGATGA-3';内参 GAPDH:上游 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3';miR-520d-5p:上游 5'-TGAGTCTACAAAGGGAAGCCC-3',下游 5'-TCTCAAACCGTAACCCACCA-3';内参 U6:上游 5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3',下游 5'-AACGCTTCACGAATGCGT-3'。每组设置 3 个复孔,实验独立重复 3 次。

1.2.7 双荧光素酶报告实验 使用 Starbase 在线数据库预测 LOXL1-AS1 的靶基因,发现 miR-520d-5p 是其潜在靶点。将包含 miR-520d-5p 结合区域的 LOXL1-AS1 的野生(WT)序列插入荧光素酶报告质粒 psiCHECK-2 的下游,构建荧光素酶报告载体 WT-LOXL1-AS1。将含 miR-520d-5p 结合位点的 LOXL1-AS1 序列进行突变(MUT),构建突变型荧光

素酶载体 MUT-LOXL1-AS1。将上述载体分别与 miR-520d-5p mimics、miR-NC 共转染 K-562 细胞。转染 48 h 后,以海肾荧光素酶为内控,双荧光素酶活性系统测定 K-562 细胞的相对荧光素酶活性。每组设置 3 个复孔,实验独立重复 3 次。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件处理数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用独立样本 *t* 检验分析两组间差异,采用单向方差分析及 Tukey 事后检验分析多组间差异。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同浓度的苍耳亭对 K-562 增殖的影响 采用不同浓度的苍耳亭孵育 K-562 细胞,与 0  $\mu$ mol/L 相比,5  $\mu$ mol/L、15  $\mu$ mol/L、30  $\mu$ mol/L、60  $\mu$ mol/L、90  $\mu$ mol/L 的苍耳亭孵育后细胞增殖抑制率显著升高( $P < 0.05$ ),后续选择 6  $\mu$ mol/L、20  $\mu$ mol/L、60  $\mu$ mol/L 浓度进行实验。见图 1。

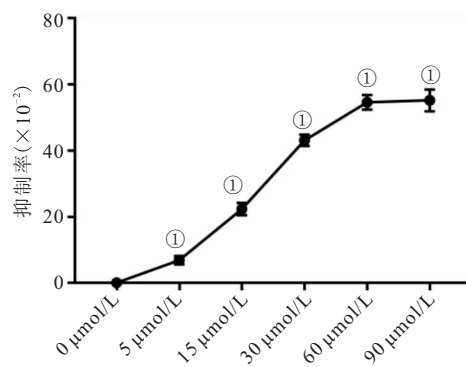


图 1 苍耳亭对 K-562 增殖的影响

Figure 1 The effect of Xanthatin on the proliferation of K-562

注:与 0  $\mu$ mol/L 组相比,① $P < 0.05$

2.2 苍耳亭对 K-562 细胞增殖、凋亡的影响 与对照组比较,苍耳亭(6、20、60  $\mu$ mol/L)组 K-562 细胞增殖抑制率、凋亡率、Bax 蛋白表达显著升高( $P < 0.05$ ),Bcl-2 蛋白表达显著降低( $P < 0.05$ );随着苍耳亭浓度的升高,其对 K-562 细胞增殖、Bcl-2 蛋白表达的抑制作用以及对细胞凋亡、Bax 蛋白表达的促进作用逐渐增强。见图 2、表 1。

2.3 苍耳亭对 K-562 中 LOXL1-AS1 和 miR-520d-5p 表达的影响 与对照组比较,苍耳亭(6、20、60  $\mu$ mol/L)组 K-562 细胞 LOXL1-AS1 表达显著降低( $P < 0.05$ ),miR-520d-5p 表达显著升高( $P < 0.05$ )。随着苍耳亭浓度的升高,其对 K-562 细胞 LOXL1-AS1 表达的抑制作用和对 miR-520d-5p 表达的促进作用逐渐增强。见表 2。

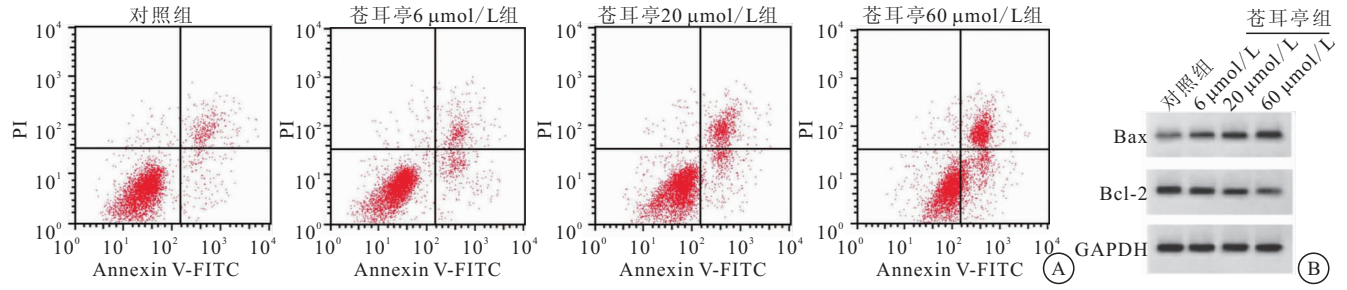


图 2 苍耳亭对 K-562 凋亡及 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

Figure 2 The effect of Xanthone on K-562 apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 protein

注: A. 苍耳亭对 K-562 凋亡率; B. 苍耳亭对 K-562 中凋亡蛋白表达

表 1 苍耳亭对 K-562 细胞增殖、凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Table 1 The effect of Xanthone on the proliferation and apoptosis of K-562 cells

组别	抑制率(%)	凋亡率(%)	Bax	Bcl-2
对照组	0.00±0.00	6.64±0.41	0.12±0.01	0.65±0.04
苍耳亭 6 μmol/L 组	7.66±0.42 <sup>①</sup>	10.40±0.45 <sup>①</sup>	0.24±0.01 <sup>①</sup>	0.52±0.03 <sup>①</sup>
苍耳亭 20 μmol/L 组	35.25±1.47 <sup>①②</sup>	19.64±0.79 <sup>①②</sup>	0.53±0.04 <sup>①②</sup>	0.33±0.02 <sup>①②</sup>
苍耳亭 60 μmol/L 组	53.71±2.02 <sup>①②③</sup>	25.05±0.85 <sup>①②③</sup>	0.76±0.04 <sup>①②③</sup>	0.15±0.01 <sup>①②③</sup>
F	3463.196	1487.306	881.912	574.700
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组相比,①P<0.05;与苍耳亭 6 μmol/L 组相比,②P<0.05;与苍耳亭 20 μmol/L 组相比,③P<0.05

表 2 苍耳亭对 K-562 中 LOXL1-AS1 和 miR-520d-5p 表达的检测( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Table 2 Xanthone's detection of LOXL1-AS1 and miR-520d-5p expression in K-562

组别	LOXL1-AS1	miR-520d-5p
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00
苍耳亭 6 μmol/L 组	0.85±0.04 <sup>①</sup>	1.76±0.10 <sup>①</sup>
苍耳亭 20 μmol/L 组	0.40±0.03 <sup>①②</sup>	3.17±0.12 <sup>①②</sup>
苍耳亭 60 μmol/L 组	0.13±0.01 <sup>①②③</sup>	5.18±0.2 <sup>①②③</sup>
F	2230.615	1397.589
P	<0.05	<0.05

注:与对照组相比,①P<0.05;与苍耳亭 6 μmol/L 组相比,②P<0.05;与苍耳亭 20 μmol/L 组相比,③P<0.05

2.4 干扰 LOXL1-AS1 对 K-562 细胞增殖、凋亡的影响 si-LOXL1-AS1 组 K-562 细胞 LOXL1-AS1 表达显著低于 si-NC 组(P<0.05),提示转染 si-LOXL1-AS1 后 K-562 细胞 LOXL1-AS1 表达受到抑制。与 si-NC 组比较,si-LOXL1-AS1 组 K-562 细胞增殖抑制率、凋亡率、Bax 蛋白表达显著升高(P<0.05),Bcl-2 蛋白表达显著降低(P<0.05)。见图 3、表 3。

2.5 LOXL1-AS1 和 miR-520d-5p 靶向关系 Starbase 在线数据库预测到 miR-520d-5p 与 LOXL1-AS1 序列间存在互补结合位点(图 4)。检测相对荧光素酶活性显示,同与 WT-LOXL1-AS1 共转染,转染 miR-520d-5p mimics 后 K-562 细胞相对荧光素酶活性显著

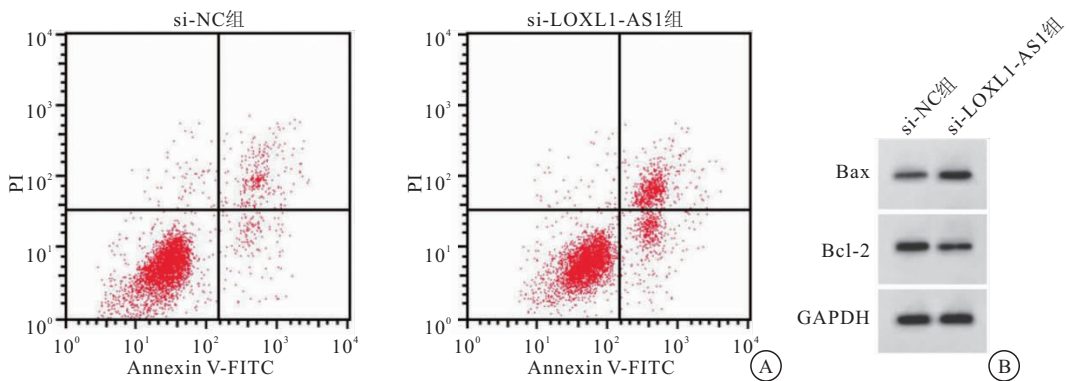


图 3 干扰 LOXL1-AS1 对 K-562 凋亡及 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

Figure 3 The effect of interference with LOXL1-AS1 on K-562 apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 proteins

注: A. 干扰 LOXL1-AS1 对 K-562 凋亡率的检测; B. 干扰 LOXL1-AS1 对 K-562 中凋亡蛋白表达的检测

表 3 干扰 LOXL1-AS1 对 K-562 细胞增殖、凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Table 3 The effect of interference with LOXL1-AS1 on the proliferation and apoptosis of K-562 cells

组别	LOXL1-AS1	miR-520d-5p	抑制率(%)	凋亡率(%)	Bax	Bcl-2
si-NC 组	1.00±0.00	1.00±0.00	0.00±0.00	6.85±0.46	0.11±0.01	0.63±0.04
si-LOXL1-AS1 组	0.24±0.02 <sup>①</sup>	3.87±0.16 <sup>①</sup>	45.08±1.35 <sup>①</sup>	22.70±0.69 <sup>①</sup>	0.58±0.04 <sup>①</sup>	0.22±0.02 <sup>①</sup>
<i>t</i>	114.000	53.813	100.178	50.525	34.198	27.504
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与 si-NC 组相比,① $P<0.05$

低于转染 miR-NC ( $P<0.05$ ); 同与 MUT-LOXL1-AS1 共转染, 转染 miR-520d-5p mimics 后 K-562 细胞相对荧光素酶活性与转染 miR-NC 比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 4。

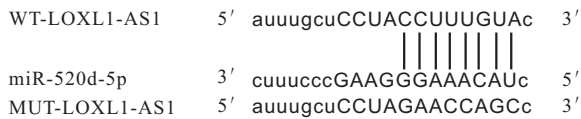


图 4 LOXL1-AS1 和 miR-520d-5p 的互补序列

Figure 4 Complementary sequences of LOXL1-AS1 and miR-520d-5p

2.6 过表达 LOXL1-AS1 对苍耳亭处理的 K-562 增殖和凋亡的影响 与对照组比较, 苍耳亭组 K-562 细胞 LOXL1-AS1 表达、Bcl-2 蛋白表达显著降低 ( $P<$

表 4 双荧光素酶报告实验( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Table 4 Double luciferase report experiment

组别	WT-LOXL1-AS1	MUT-LOXL1-AS1
miR-NC 组	1.03±0.08	1.00±0.09
miR-520d-5p 组	0.37±0.02 <sup>①</sup>	0.98±0.07
<i>t</i>	24.011	0.526
<i>P</i>	<0.05	0.606

注:与 miR-NC 组相比,① $P<0.05$

0.05), miR-520d-5p 表达、增殖抑制率、凋亡率、Bax 蛋白表达显著升高(均  $P<0.05$ ); 与苍耳亭组比较, 苍耳亭 + pcDNA-LOXL1-AS1 组 K-562 细胞 LOXL1-AS1 表达、Bcl-2 蛋白表达显著升高(均  $P<0.05$ ), miR-520d-5p 表达、增殖抑制率、凋亡率、Bax 蛋白表达显著降低(均  $P<0.05$ )。见图 5、表 5。

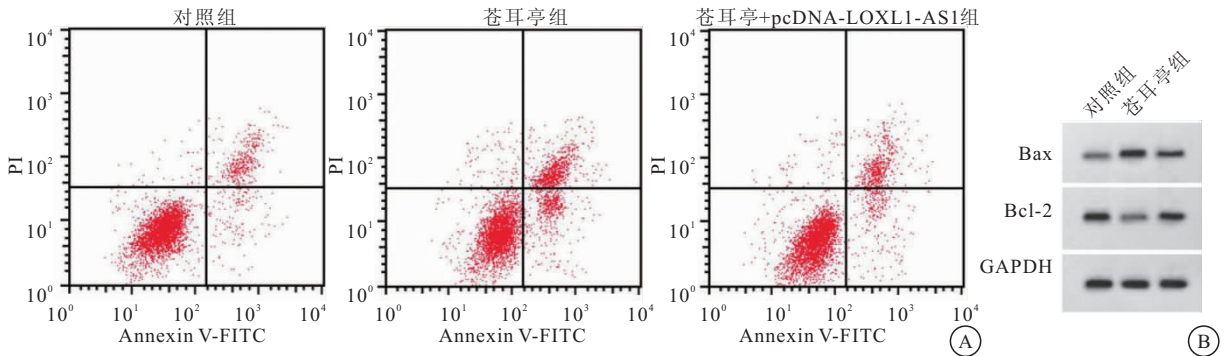


图 5 LOXL1-AS1 可逆转苍耳亭对 K-562 凋亡及 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

Figure 5 LOXL1-AS1 can reverse the effects of Xanthone on K-562 apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 proteins

注:A. LOXL1-AS1 可逆转苍耳亭对 K-562 凋亡率的作用;B. LOXL1-AS1 可逆转苍耳亭对 K-562 中凋亡蛋白的表达

表 5 LOXL1-AS1 可逆转苍耳亭对 K-562 抑制率糖酵解活性和凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Table 5 LOXL1-AS1 can reverse the effect of Xanthone on K-562 inhibition rate, glycolytic activity and apoptosis

组别	LOXL1-AS1	miR-520d-5p	抑制率(%)	凋亡率(%)	Bax	Bcl-2
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	0.00±0.00	6.82±0.43	0.12±0.01	0.64±0.05
苍耳亭组	0.14±0.01 <sup>①</sup>	5.20±0.10 <sup>①</sup>	53.59±1.33 <sup>①</sup>	24.96±1.15 <sup>①</sup>	0.77±0.05 <sup>①</sup>	0.14±0.02 <sup>①</sup>
苍耳亭+pcDNA-LOXL1-AS1 组	0.76±0.04 <sup>②</sup>	2.08±0.10 <sup>②</sup>	13.80±0.74 <sup>②</sup>	13.68±0.71 <sup>②</sup>	0.32±0.03 <sup>②</sup>	0.48±0.04 <sup>②</sup>
<i>F</i>	3127.765	6421.680	10392.779	1126.080	885.000	391.200
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组相比,① $P<0.05$ ;与苍耳亭组相比,② $P<0.05$

### 3 讨论

尽管白血病的治理有明显改善,但传统化疗药物的疗效较低,多数患者复发频繁,预后较差,死亡率仍然居高不下<sup>[11]</sup>。天然产物由于其来源广泛、价格低廉、抗肿瘤活性良好等优势已成为化疗药物的主要来源。近年来,苍耳亭已被证实对多种癌细胞具有显著

的抗肿瘤活性。蔡亚云等<sup>[12]</sup>报道苍耳亭对体内外肝癌细胞增殖和转移具有较强的抑制作用。狄泽敏等<sup>[13]</sup>证实苍耳亭可激活内质网应激,诱导胶质瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长。Li 等<sup>[14]</sup>指出苍耳亭可能通过激活 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)通路进而抑制小鼠黑色素瘤细胞增殖,抑制血管生成。本研究发现选择 6、

20、60  $\mu\text{mol/L}$  苍耳亭浓度进行实验,苍耳亭处理后白血病细胞 K-562 细胞增殖抑制率显著升高,凋亡率明显增加。此外,促凋亡蛋白 Bax 表达上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,这与苍耳亭的凋亡诱导作用一致。以上研究表明苍耳亭通过抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡在白血病中具有抗肿瘤活性。

LOXL1-AS1 是多种肿瘤进展的致癌因子,胃癌中 LOXL1-AS1 表达上调预示患者预后不良,并通过诱导胃癌细胞增殖、转移加速胃癌的恶化<sup>[15]</sup>。前列腺癌中 LOXL1-AS1 表达增加,下调 LOXL1-AS1 可以抑制肿瘤细胞增殖和细胞周期进展<sup>[16]</sup>。本研究发现苍耳亭处理显著下调 K-562 细胞中 LOXL1-AS1 表达水平。干扰 LOXL1-AS1 可抑制 K-562 细胞增殖,下调 Bcl-2 表达,上调 Bax 表达,促进细胞凋亡,这与苍耳亭抗肿瘤功能类似,提示 LOXL1-AS1 可能介导苍耳亭抗肿瘤作用。此外,本研究发现苍耳亭处理显著上调 miR-520d-5p 水平。既往研究报道 miR-520d-5p 表达可能参与胃癌发生过程<sup>[17]</sup>。宫颈癌中 miR-520d-5p 通过靶向 PTK2 抑制癌细胞恶性生物学行为<sup>[18]</sup>。越来越多研究表明 lncRNA 可以直接与 miRNA 相互作用,调节 miRNA 表达和活性,参与多种细胞过程<sup>[19]</sup>。LOXL1-AS1 通过靶向 miR-423-5p 参与肺腺癌发生发展<sup>[20]</sup>。本研究证实 miR-520d-5p 是 LOXL1-AS1 的直接靶点,且 miR-520d-5p 表达受 LOXL1-AS1 负向调控,提示 LOXL1-AS1/ miR-520d-5p 轴可能介导苍耳亭的抗肿瘤作用。进一步研究表明,过表达 LOXL1-AS1 明显减弱苍耳亭处理对 K-562 细胞增殖、凋亡以及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响,基本恢复细胞增殖能力和凋亡水平,表明苍耳亭可能通过调控 LOXL1-AS1/ miR-520d-5p 轴进而影响 K-562 细胞的增殖和凋亡。

#### 4 结论

苍耳亭可抑制白血病细胞增殖,诱导细胞凋亡,其机制可能与抑制 LOXL1-AS1/ miR-520d-5p 轴有关,初步揭示了苍耳亭在白血病中的抗癌机制,为苍耳亭作为一种有前景的白血病抗肿瘤候选药物的开发奠定了理论基础。

#### 【参考文献】

[1] BI S X, LI X H, WEI C S, *et al.* The antitumour growth and antiangiogenesis effects of xanthatin in murine glioma dynamically evaluated by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging[J]. *Phytother Res*, 2019, 33(1): 149-158.

[2] 吴育,曹刚,石美琴,等.基于分子对接虚拟技术及 Western blotting 实验考察苍耳亭对肝癌//上皮间质转化作用靶点的影响[J]. *药物评价研究*, 2017, 40(11): 1535-1540.

[3] 任淑珍,史天陆,张蕾,等.苍耳亭对宫颈癌 SiHa 细胞增殖、凋亡和 GSTP1 的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(6): 787-792.

[4] ZHANG L, RUAN J, YAN L, *et al.* Xanthatin induces cell cycle arrest at G2/M checkpoint and apoptosis via disrupting NF- $\kappa$ B pathway in A549 non-small-cell lung cancer cells[J]. *Molecules*, 2012, 17(4): 3736-3750.

[5] 赵振慧,李妍,李迅.长链非编码 RNA TTN-AS1 靶向 miR-134-5p 调控乳腺癌细胞的生长和转移[J]. *西部医学*, 2021, 33(7): 942-948.

[6] 刘露,杨福兵,朱明建,等. lncRNA CASC2 靶向 miR-634 表达抑制神经胶质瘤细胞的生物学行为[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(16): 1976-1980, 1986.

[7] XIE N, FEI X, LIU S, *et al.* lncRNA LOXL1-AS1 promotes invasion and proliferation of non-small-cell lung cancer through targeting miR-324-3p[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(10): 6403-6412.

[8] LI M, CAI O, TAN S. LOXL1-AS1 Drives The Progression Of Gastric Cancer Via Regulating miR-142-5p/PIK3CA Axis[J]. *Oncotargets Ther*, 2019, 12: 11345-11357.

[9] CORREIA N C, MELÃO A, PÓVOA V, *et al.* microRNAs regulate TAL1 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(7): 8268-8281.

[10] JIAO J, WANG Y, SUN X, *et al.* Midazolam induces A549 cell apoptosis in vitro via the miR-520d-5p/STAT3 pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(3): 1365-1373.

[11] KOUHPEIKAR H, BUTLER A E, BAMIAN F, *et al.* Curcumin as a therapeutic agent in leukemia[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12404-12414.

[12] 蔡亚云,吴育,杨水英,等.苍耳亭抑制肝癌 HepG2 体内外药效研究[J]. *世界中西医结合杂志*, 2019, 14(7): 946-949.

[13] 狄泽敏.苍耳亭通过 PI3K/AKT/mTOR 通路调节自噬抑制胶质瘤生长[D].合肥:安徽医科大学,2019.

[14] LI W D, WU Y, ZHANG L, *et al.* Characterization of xanthatin: anticancer properties and mechanisms of inhibited murine melanoma in vitro and in vivo[J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(10): 865-873.

[15] 李明,谭诗云,柴红.敲低长链非编码 RNA LOXL1-AS1 表达对胃癌细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2020, 29(5): 515-519.

[16] LONG B, LI N, XU X X, *et al.* Long noncoding RNA LOXL1-AS1 regulates prostate cancer cell proliferation and cell cycle progression through miR-541-3p and CCND1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(2): 561-568.

[17] 邓铃,罗霞,杨旸,等. miR-143 和 miR-520d-5p 在胃癌组织中的异常表达[J]. *广东药学院学报*, 2013, 29(6): 660-664.

[18] ZHANG L, LIU F, FU Y, *et al.* MiR-520d-5p functions as a tumor-suppressor gene in cervical cancer through targeting PTK2[J]. *Life Sci*, 2020, 254: 117558.

[19] 赵志国,张力平. miRNA 和 lncRNA 相互作用与恶性肿瘤相关性的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(18): 2991-2994.

[20] LI W, ZHANG B, JIA Y, *et al.* lncRNA LOXL1-AS1 regulates the tumorigenesis and development of lung adenocarcinoma through sponging miR-423-5p and targeting MYBL2[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(2): 689-699.