

· 基础研究 ·

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.09.004

## 地锦草乙醇提取物通过 circRHOT1/miR-29a-3p 轴抑制结直肠癌 SW480 细胞的恶性生物学行为

樊红革<sup>a</sup>, 戴卫波<sup>b</sup>, 张学峰<sup>c</sup> (中山市中医院 a. 肛肠科; b. 中药药理实验室; c. 第三外科, 广东 中山 528400)

**[摘要]** **目的:** 探讨地锦草乙醇提取物(EEEH)对人结直肠癌 SW480 细胞生物学行为的影响及其分子机制。**方法:** 体外培养 SW480 细胞, 实验分为 Con 组、EEEH-L 组、EEEH-M 组、EEEH-H 组、si-NC 组、si-circRHOT1 组、EEEH-H+pcDNA 组、EEEH-H+pcDNA-circRHOT1 组, 分别以 si-NC、si-circRHOT1、pcDNA、pcDNA-circRHOT1 转染 SW480 细胞, 采用 CCK-8 法、细胞克隆形成实验、Transwell 实验分别检测转染后各组细胞的增殖、迁移及侵袭能力, qPCR 法检测转染后各组 SW480 细胞 circRHOT1 和 miR-29a-3p 的表达, WB 法检测各组细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达。双荧光素酶报告基因实验检测 circRHOT1 与 miR-29a-3p 之间的靶向关系。**结果:** 与 Con 组比较, EEEH-L 组、EEEH-M 组、EEEH-H 组 SW480 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达均明显降低(均  $P < 0.05$ ), circRHOT1 的表达均降低(均  $P < 0.05$ )而 miR-29a-3p 的表达均升高(均  $P < 0.05$ )且呈剂量依赖性; 细胞的存活率、细胞克隆形成数、迁移及侵袭细胞数均减少(均  $P < 0.05$ )。circRHOT1 可靶向负调控 miR-29a-3p 的表达。敲减 circRHOT1 可抑制 SW480 细胞的增殖、迁移及侵袭能力, 而过表达 circRHOT1 则可减弱 EEEH 对 SW480 细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用。**结论:** EEEH 可通过调控 circRHOT1/miR-29a-3p 轴而抑制结直肠癌 SW480 细胞的增殖、迁移及侵袭能力。

**[关键词]** 结直肠癌; SW480 细胞; 地锦草; 乙醇提取物; circRHOT1; miR-29a-3p; 增殖; 迁移; 侵袭

**[中图分类号]** R735.3; R730.52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)09-0806-07

## Ethanol extract from *Euphorbia humifusa* inhibits the malignant biological behaviors of colorectal cancer SW480 cells by regulating the circRHOT1/miR-29a-3p molecular axis

FAN Hongge<sup>a</sup>, DAI Weibo<sup>b</sup>, ZHANG Xuefeng<sup>c</sup> (a. Department of Anorectal Medicine; b. Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine; c. the Third Department of Surgery, Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan 528400, Guangdong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of ethanol extract from *euphorbia humifusa* (EEEH) on the biological behaviors of human colorectal cancer SW480 cells and its molecular mechanism. **Methods:** Human colorectal cancer SW480 cells were cultured *in vitro*, divided into the following experimental groups: Con group, EEEH-L group, EEEH-M group, EEEH-H group, si-NC group, si-circRHOT1 group, EEEH-H+pcDNA group and EEEH-H+pcDNA-circRHOT1 group and transfected with si-NC, si-circRHOT1, pcDNA and PCDNA-circRHOT1 respectively. CCK-8 assay, cell clone formation assay, Transwell assay were used to detect cell proliferation, migration and invasion ability in each group after transfection. qPCR method was employed to detect the expression of circRHOT1 and miR-29a-3p in all the groups of SW480 cells after transfection, and the expressions of MMP-2 and MMP-9 proteins were detected by WB. The dual luciferase reporter experiment was used to detect the targeting relationship between circRHOT1 and miR-29a-3p. **Results:** Compared with the Con group, the protein expressions of MMP-2 and MMP-9 in SW480 cells in EEEH-L, EEEH-M, and EEEH-H groups were significantly decreased (all  $P < 0.05$ ), the expression of circRHOT1 decreased (all  $P < 0.05$ ) and the expression of miR-29a-3p increased (all  $P < 0.05$ ) in a dose-dependent manner. The cell survival rate, the number of cell clone formation and the number of migration and invasive cells were decreased (all  $P < 0.05$ ). circRHOT1 can target and negatively regulate the expression of miR-29a-3p. Knockdown of circRHOT1 can inhibit the proliferation, migration and invasion of SW480 cells, while overexpression of circRHOT1 can attenuate the inhibitory effects of EEEH on the proliferation, migration and invasion of SW480 cells. **Conclusion:** EEEH can inhibit the proliferation, migration and invasion of colorectal cancer SW480 cells by regulating the

**[基金项目]** 广东省中医药局中医科研项目(No. 20201371)

**[作者简介]** 樊红革(1983—), 男, 硕士生, 副主任中医师, 主要从事中西医结合治疗肛肠癌的研究, E-mail: fvbcaj@163.com

**[通信作者]** 樊红革, E-mail: fvbcaj@163.com

circRHOT1/miR-29a-3p axis.

**[Key words]** colorectal cancer; SW480 cell; *Euphorbia humifusa*; ethanol extract; circRHOT1; miR-29a-3p; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(9): 806-812. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.09.004]

结直肠癌是中国常见的一种恶性肿瘤,其发病率与病死率逐年上升,大部分结直肠癌患者早期症状不明显,部分患者确诊时已处于中晚期甚至出现转移<sup>[1]</sup>。化疗等传统治疗方法可促使结直肠癌患者产生耐药性,因而寻找安全有效的中草药或制剂有助于改善患者预后<sup>[2-4]</sup>。地锦草属于大戟科大戟属地锦草植物,具有抗炎、抗菌等作用,并含有黄酮等多种化合物。研究<sup>[5]</sup>表明,地锦草可抑制宫颈癌细胞增殖及诱导其细胞凋亡。但地锦草乙醇提取物(ethanol extract from *Euphorbia humifusa*, EEEH)对结直肠癌细胞生物学行为的影响尚未可知。环状 RNA(circular RNA, circRNA)是一种由 5'端与 3'端以共价键形成的闭合环状 RNA 分子,研究<sup>[6]</sup>表明, circRHOT1 在肝细胞癌中表达上调,并可促进肝细胞癌细胞增殖及转移。StarBase 预测显示 circRHOT1 与 miR-29a-3p 存在结合位点。miR-29a-3p 在结直肠癌细胞中表达下调<sup>[7]</sup>。但 circRHOT1/miR-29a-3p 轴在结直肠癌发生及发展过程中的作用仍不清楚。因此,本研究主要探究 EEEH 是否通过 circRHOT1/miR-29a-3p 轴调控结直肠癌 SW480 细胞的恶性生物学行为,为探究结直肠癌的治疗靶点和潜在新药提供实验资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用细胞与试剂

人正常结肠上皮细胞 FHC 及人结直肠癌细胞 SW480 购自美国 ATCC。地锦草购自亳州市安博药业有限公司。TRIzol 试剂、Lipofectamine2000 购自美国 Thermo Fisher 公司,逆转录与荧光定量 PCR 试剂购自北京 TIANGEN 生化公司, CCK-8 试剂、BCA 蛋白测定试剂盒购自上海 Beyotime 生物公司, miR-NC、miR-29a-3p mimic、si-NC、si-circRHOT1、pcDNA、pcDNA-circRHOT1 均购自上海吉码生物制药有限公司,双荧光素酶报告基因载体及其活性检测试剂盒购自美国 Promega 公司,兔抗人 MMP-2、MMP-9 抗体与 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 均购自美国 Santa Cruz 公司。

### 1.2 EEEH 的制备<sup>[8]</sup>

取地锦草 40 g,放置在已经过硫酸浸泡和高压处理的锥形瓶中,加入 400 mL 75%乙醇浸泡 24 h 后,将锥形瓶置于 100 °C 水浴锅内,并将其与回流装置连接,蒸馏 3 h 后冷却至常温,其上清液经滤纸过滤 3 次,

10 000×g 离心 5 min,采用旋转冻干法将其制成干粉,用 DMSO 溶解(终浓度为 0.05%),即得 EEEH(获得率为 65.32%),用不含血清与双抗的培养基稀释浓度至 12.5、25、50、150 μg/mL。

### 1.3 EEEH 处理 FHC 和 SW480 细胞实验剂量的探索

用不同质量浓度(12.5、25、50、150 μg/mL)的 EEEH 分别处理 FHC 和 SW480 细胞,以不加 EEEH 处理的细胞作为对照组,以 DMSO(0.05%)作为溶剂对照组(DMSO 组)。利用 CCK-8 实验检测不同质量浓度的 EEEH 对 FHC 和 SW480 细胞增殖的影响,由此得出的结果中选择 3 种浓度作为低、中、高剂量进行后续实验。

### 1.4 实验分组与细胞转染

将 200 μL SW480 细胞( $2 \times 10^5$  个/mL)接种于 6 孔板,加入含有不同质量浓度(25、50、150 μg/mL) EEEH 的培养液培养 24 h,分别记为 EEEH-L 组、EEEH-M 组、EEEH-H 组。同时将正常培养的 SW480 细胞记为 Con 组。细胞转染:用 Lipofectamine2000 将 si-NC、si-circRHOT1 分别转染 SW480 细胞,分别记为 si-NC 组、si-circRHOT1 组,将 pcDNA、pcDNA-circRHOT1 分别转染 SW480 细胞,转染成功后加入含 150 μg/mL EEEH 的培养液培养 24 h,分别记为 pcDNA 组、pcDNA-circRHOT1 组、EEEH-H+pcDNA 组、EEEH-H+pcDNA-circRHOT1 组。

### 1.5 CCK-8 实验检测转染后各组 SW480 细胞的增殖能力

将各组 FHC 细胞和 SW480 细胞接种于 96 孔板,每孔  $3 \times 10^3$  个细胞,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24 h 后,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,再培养 2 h 后应用酶标仪在 450 nm 处检测光密度(D)值,细胞存活率=(实验组 D 值/对照组 D 值)×100%。每组设置 3 个复孔,实验重复 3 次。

### 1.6 细胞克隆形成实验检查转染后各组 SW480 细胞的克隆形成能力

将转染后各组 SW480 细胞(500 个/孔)接种于 6 孔板中,置于培养箱内培养 14 d,弃培养基,预冷 PBS 洗涤,甲醇固定细胞 20 min,1%结晶紫染色液染色 15 min,PBS 洗涤,在低倍镜下(×4)拍照并统计 SW480 细胞克隆形成数。每组设置 3 个复孔,实验重复 3 次。

### 1.7 Transwell 实验检测转染后各组 SW480 细胞的迁移及侵袭能力

将转染后各组 SW480 细胞( $1 \times 10^5$  个/孔)接种于

预铺(侵袭实验)或未铺(迁移实验)基质胶的上室,下室加入600  $\mu\text{L}$ 含有10%胎牛血清的培养液,于培养箱内培养48 h。迁移或侵袭的SW480细胞经4%多聚甲醛固定20 min,1%结晶紫染色10 min,于显微镜下观察统计侵袭或迁移细胞数。每组设置3个复孔,实验重复3次。

### 1.8 qPCR检测转染后各组SW480细胞中circRHOT1与miR-29a-3p的表达

取转染后各组SW480细胞,加入TRIzol试剂提取细胞总RNA,逆转录合成cDNA。取cDNA 2  $\mu\text{L}$ 进行qPCR实验,反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  2 min,95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,共计40个循环。引物序列:circRHOT1正向引物为5'-ATCACCATTCCAGCTGATGT-3',反向引物为5'-TGCTGTCTTTGTCTGTTCTTTC-3';GAPDH正向引物为5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',反向引物为5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3';miR-29a-3p正向引物为5'-ACCTTGACCAGAACACCATCGAG-3',反向引物为5'-CAGGGTCCAGGTCAGGTGTGTA-3';U6正向引物为5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',反向引物为5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'。以GAPDH或U6作为内参照基因,通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算目的基因的相对表达量。每组设置3个复孔,实验重复3次。

### 1.9 双荧光素酶报告基因实验验证circRHOT1与miR-29a-3p之间的靶向关系

StarBase预测circRHOT1与miR-29a-3p之间存在互补序列。将circRHOT1的预测结合位点序列克隆至pmirGLO载体上构建野生型载体circRHOT1-WT,同时将circRHOT1靶位点突变的序列克隆至pmirGLO载体上构建突变型载体circRHOT1-MUT,采用Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000将circRHOT1-WT、circRHOT1-MUT分别与miR-NC或miR-29a-3p mimic共转染至

SW480细胞,继续培养24 h,用双荧光素酶检测试剂盒检测各组SW480细胞的荧光素酶活性。每组设置3个复孔,实验重复3次。

### 1.10 WB法检测各组SW480细胞中MMP-2、MMP-9蛋白的表达

用RIPA裂解液裂解各组SW480细胞,并提取其总蛋白,BCA法检测蛋白浓度,每个样本取40  $\mu\text{g}$ 蛋白进行SDS-PAGE,转膜,5%脱脂牛奶封闭2 h,加入1:1 000稀释的MMP-2、MMP-9一抗与1:2 000稀释的内参GAPDH抗体后4  $^{\circ}\text{C}$ 处理过夜,加入1:3 000稀释的二抗后37  $^{\circ}\text{C}$ 处理2 h,ECL显色液显色。以GAPDH为内参,应用Quantity One软件分析目的蛋白的相对表达量。每组设置3个复孔,实验重复3次。

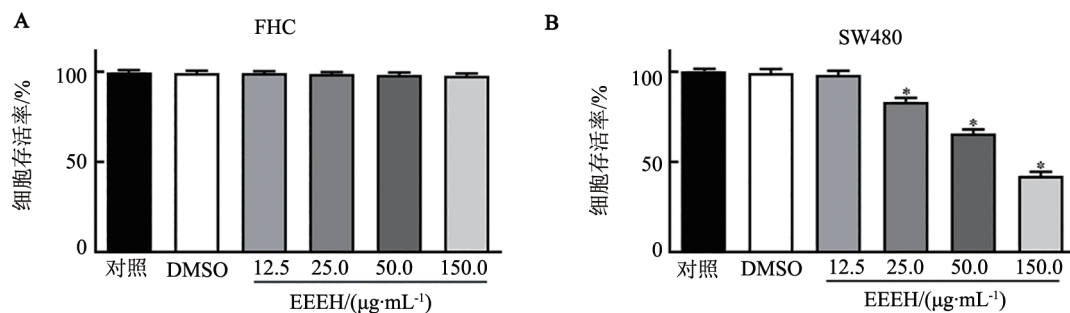
### 1.11 统计学处理

采用SPSS21.0统计学软件分析数据,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 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 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同质量浓度的EEEH对FHC细胞及SW480细胞增殖能力的影响

与对照组比较,DMSO组及不同质量浓度EEEH处理的各组FHC细胞的存活率均无明显变化(均 $P>0.05$ ,图1A);与SW480细胞对照组比较,25、50、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ EEEH处理的各组SW480细胞的存活率均明显降低(均 $P<0.05$ ),但12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ EEEH处理组SW480细胞的存活率无明显变化( $P>0.05$ ,图1B),故用25、50、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ EEEH进行后续实验。同时实验结果还说明,EEEH选择性地抑制结直肠癌SW480细胞而不抑制正常人结肠上皮FHC细胞的增殖。



与对照组比较,\* $P<0.05$

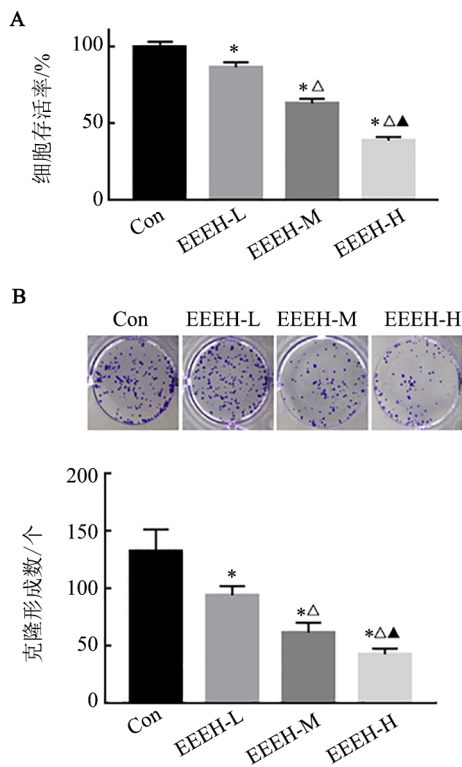
图1 不同质量浓度EEEH对FHC细胞(A)及SW480(B)细胞增殖能力的影响

### 2.2 EEEH呈剂量依赖性地抑制SW480细胞增殖

CCK-8实验和细胞克隆形成实验检测结果(图2)显示,与Con组比较,EEEH-L组、EEEH-M组和EEEH-H

组SW480细胞的存活率明显降低(均 $P<0.05$ ),细胞克隆形成数也显著减少(均 $P<0.05$ ),且呈剂量依赖性。





与 Con 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 EEEH-L 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 EEEH-M 组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$   
 图 2 CCK-8 法(A)和细胞克隆形成实验(B)检测不同质量浓度的 EEEH 对 SW480 细胞增殖的影响

### 2.3 EEEH 呈剂量依赖性地抑制 SW480 细胞的迁移及侵袭

Transwell 实验检测结果(图 3A)显示, 与 Con 组

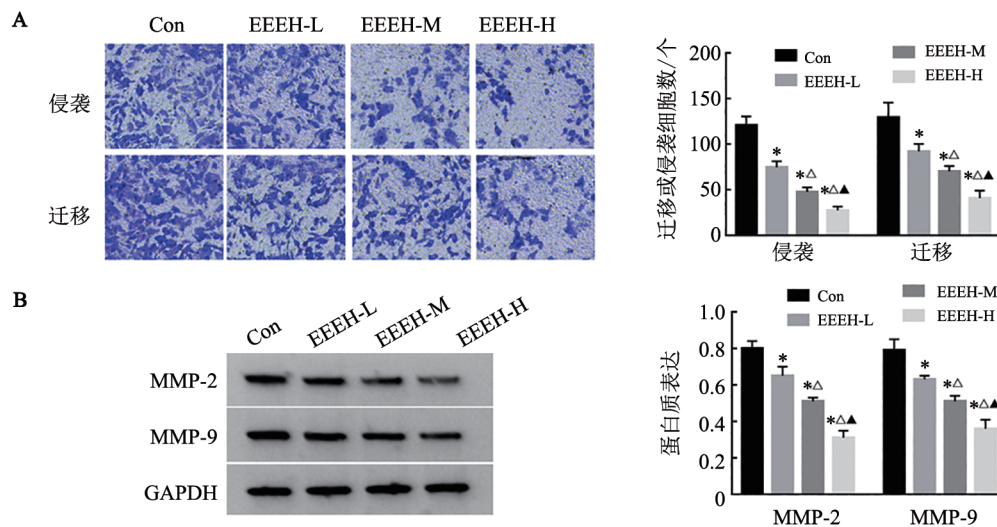
比较, EEEH-L、EEEH-M、EEEH-H 组 SW480 细胞的迁移及侵袭数目均明显减少(均  $P < 0.05$ ), 且呈剂量依赖性; WB 法检测结果(图 3B)显示, 与 Con 组比较, EEEH-L、EEEH-M、EEEH-H 组 SW480 细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平也均显著降低(均  $P < 0.05$ ), 且呈剂量依赖性。

### 2.4 EEEH 对 SW480 细胞中 circRHOT1 与 miR-29a-3p 表达的影响

qPCR 实验检测结果(图 4)显示, 与 Con 组比较, EEEH-L 组、EEEH-M 组、EEEH-H 组 circRHOT1 的表达均降低(均  $P < 0.05$ ), miR-29a-3p 的表达均升高(均  $P < 0.05$ ), 且呈剂量依赖性。

### 2.5 circRHOT1 靶向 miR-29a-3p 并负调控其表达

StarBase 网站预测 circRHOT1 与 miR-29a-3p 之间存在互补结合位点(图 5A)。双荧光素酶报告实验检查结果(图 5B)显示, 与 miR-NC+circRHOT1-WT 组比较, miR-29a-3p+circRHOT1-WT 组荧光素酶活性显著降低( $P < 0.05$ ); 与 miR-NC+circRHOT1-MUT 组比较, miR-29a-3p+MUT-circRHOT1 组荧光素酶活性无明显变化; 实验结果说明, circRHOT1 与 miR-29a-3p 之间存在靶向关系。qPCR 实验结果(图 5C)显示, 与 si-NC 组比较, si-circRHOT1 组 miR-29a-3p 的表达量升高( $P < 0.05$ ); 与 pcDNA 组比较, pcDNA-circRHOT1 组 miR-29a-3p 的表达量降低( $P < 0.05$ ); 实验结果说明, circRHOT1 靶向 miR-29a-3p 并负调控其表达。



与 Con 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 EEEH-L 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 EEEH-M 组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$   
 图 3 Transwell 实验(A,  $\times 200$ )和 WB 法(B)检测不同质量浓度 EEEH 对 SW480 细胞迁移和侵袭及其相关蛋白表达的影响

### 2.6 敲减 circRHOT1 表达可抑制 SW480 细胞的增殖、迁移及侵袭能力

qPCR 检测结果显示, 与 si-NC 组比较, si-circRHOT1

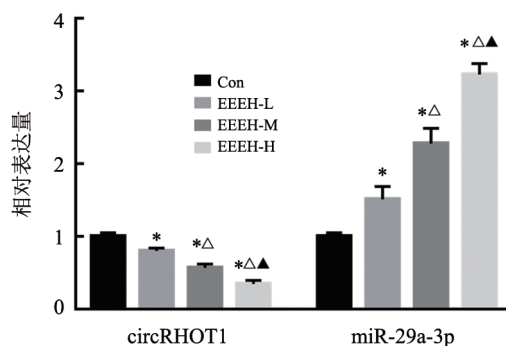
组 SW480 细胞中, circRHOT1 表达水平显著降低, miR-29a-3p 表达显著升高(图 6A, 均  $P < 0.05$ ), 说明在 SW480 细胞中成功敲减了 circRHOT1 的表达, 同时说

明 circRHOT1 负调控 miR-29a-3p 的表达。CCK-8 法实验(图 6B)、细胞克隆形成实验(图 6C)、Transwell 实验(图 6D)和 WB 法(图 6E)检测结果显示,与 si-NC 组比较,si-circRHOT1 组 SW480 细胞的存活率降低 ( $P<0.05$ )、细胞克隆形成数目、迁移及侵袭细胞数均减少(均  $P<0.05$ )和迁移和侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 蛋白水平均降低(均  $P<0.05$ )。实验结果说明,敲减 circRHOT1 通过上调 miR-29a-3p 表达抑制 SW480 细胞的增殖、迁移和侵袭。

### 2.7 过表达 circRHOT1 可抵抗 EEEH 对 SW480 细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用

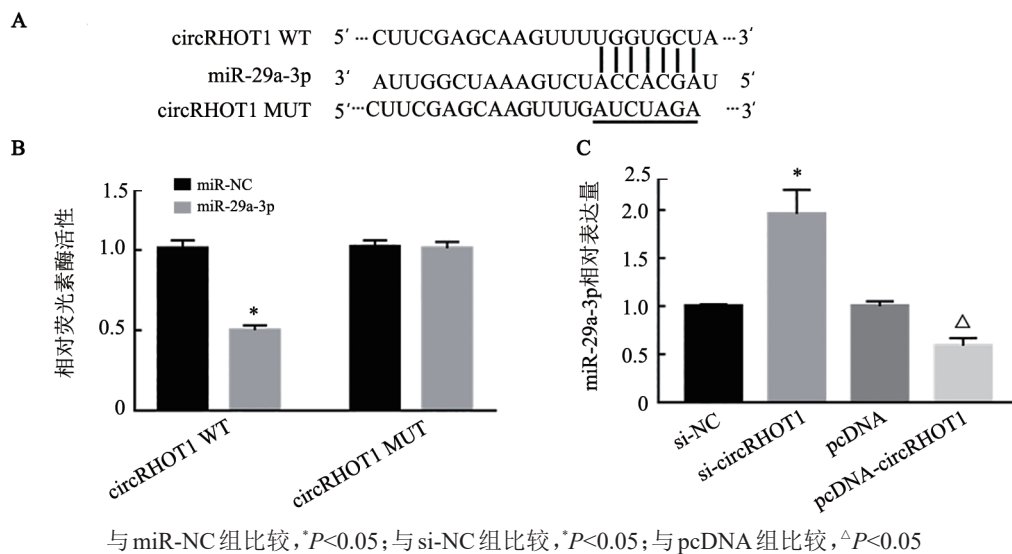
qPCR 实验结果(图 7A)显示,与 EEEH-H+pcDNA 组比较,EEEH-H+pcDNA-circRHOT1 组 SW480 细胞中 circRHOT1 的表达显著升高而 miR-29a-3p 表达显著降低(均  $P<0.05$ ),说明在 SW480 细胞中成功过表达了 circRHOT,同时说明 circRHOT1 调控 miR-29a-3p 的表达使其表达下调。CCK-8 实验(图 7B)、细胞克隆形成实验(图 7C)、Transwell 实验(图 7D)和 WB 法(图 7E)检测结果显示,与 EEEH-H+pcDNA 组比较,EEEH-H+pcDNA-circRHOT1 组 SW480 细胞的存活率升高

( $P<0.05$ ),细胞克隆形成数目、迁移及侵袭细胞数均增加(均  $P<0.05$ ),迁移和侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 蛋白水平均升高(均  $P<0.05$ )。实验结果说明,过表达 circRHOT1 可以抵抗 EEEH 对 circRHOT1 表达的抑制作用,通过下调 miR-29a-3p 表达促进了 SW480 细胞的增殖、迁移和侵袭。



与 Con 组比较, \* $P<0.05$ ; 与 EEEH-L 组比较, Δ $P<0.05$ ; 与 EEEH-M 组比较, ▲ $P<0.05$

图 4 不同质量浓度的 EEEH 对 SW480 细胞中 circRHOT1 和 miR-29a-3p 表达的影响



与 miR-NC 组比较, \* $P<0.05$ ; 与 si-NC 组比较, \* $P<0.05$ ; 与 pcDNA 组比较, Δ $P<0.05$   
A: circRHOT1 与 miR-29a-3p 之间的结合位点; B: 双荧光素酶报告基因实验检测结果;  
C: qPCR 法检测敲减和过表达 circRHOT1 对 miR-29a-3p 的表达的影响

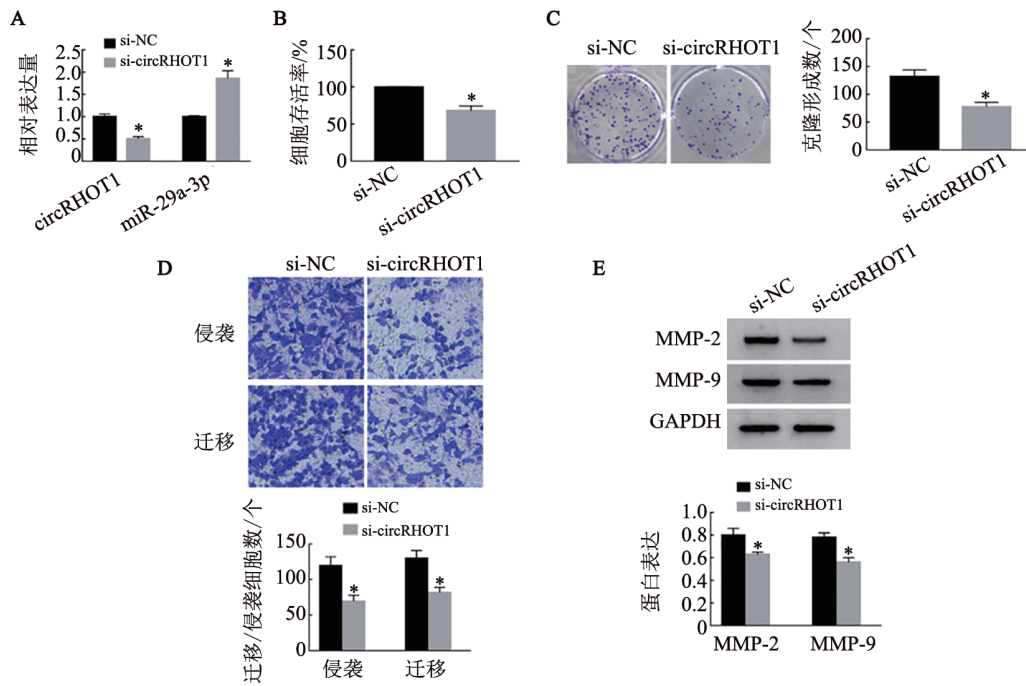
图 5 circRHOT1 靶向 miR-29a-3p 并负调控其表达

## 3 讨论

结直肠癌是威胁人类生命安全的恶性肿瘤,探寻控制结直肠癌复发、转移的新型药物及治疗方案具有重要意义。既往研究<sup>[9]</sup>显示,某些中药具有抗结直肠癌作用,并可调节结直肠癌细胞的生物学行为。circRNA 在结直肠癌中表达异常,并可通过调节 miRNA/mRNA 表达而参与结直肠癌发生发展过程,

还可能作为结直肠癌治疗的潜在靶点<sup>[10-11]</sup>。

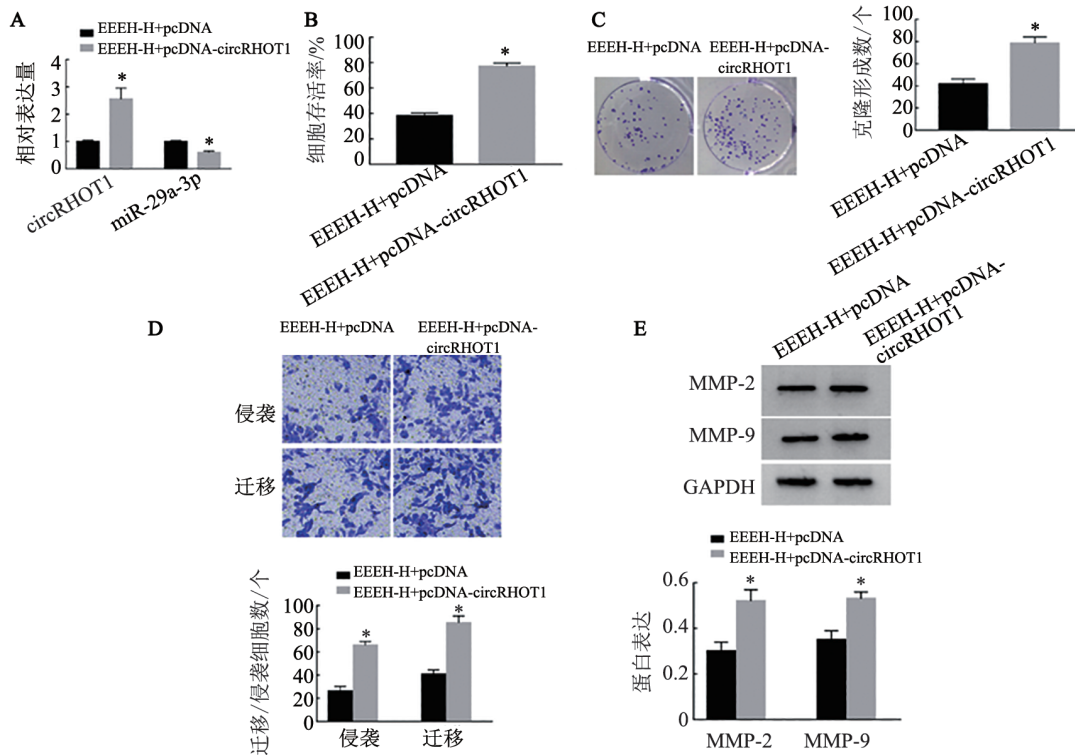
地锦草可抑制肝癌组织新生血管生成及炎症反应,从而抑制肝癌细胞的生长<sup>[12]</sup>。地锦草可抑制乳腺癌细胞的侵袭及转移<sup>[13]</sup>。但 EEEH 与结直肠癌的关系尚未可知。本研究结果显示,EEEH 能够以质量浓度依赖性方式降低 SW480 细胞的存活率、细胞克隆形成数,提示 EEEH 可抑制 SW480 细胞的增殖。MMP-2、MMP-9 属于基质金属蛋白酶,可通过降解细



与 si-NC 组比较, \* $P < 0.05$

A: qPCR 法检测转染后 SW480 细胞中 circRHOT1 和 miR-29a-3p 的表达; B: CCK-8 法检测转染后 SW480 细胞的增殖; C: 细胞克隆形成实验检测转染后 SW480 细胞的克隆形成能力; D: Transwell 实验检测转染后 SW480 细胞的迁移及侵袭能力( $\times 200$ ); E: WB 法检测迁移和侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 的表达

图 6 敲减 circRHOT1 表达对各组 SW480 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响



与 EEEH-H+pcDNA 组比较, \* $P < 0.05$

图 7 EEEH 联合过表达 circRHOT1 处理对 SW480 细胞 circRHOT1 和 miR-29a-3p 表达(A)、增殖(B、C)、迁移和侵袭(D,  $\times 200$ )及其相关蛋白表达(E)的影响

胞外基质沉积而促进细胞转移<sup>[4]</sup>。本研究结果显示, EEEH 处理后结肠癌转移及侵袭细胞数减少, 并可

抑制 MMP-2、MMP-9 表达, 提示 EEEH 可抑制 SW480 细胞的迁移及侵袭, 其作用机制可能与抑制



MMP表达有关。

circRHOT1在胰腺癌细胞中呈高表达,并可通过充当miR-125a-3p的海绵分子而促进胰腺癌细胞的增殖及侵袭<sup>[15]</sup>。circRHOT1过表达可促进胰腺癌细胞的增殖及侵袭<sup>[16]</sup>。有研究<sup>[17-18]</sup>表明,miR-29a-3p在乳腺癌细胞中低表达,上调miR-29a-3p可抑制乳腺癌细胞增殖及抑制乳腺癌、前列腺癌细胞转移。本研究初步证实circRHOT1可充当miR-29a-3p的海绵分子。EEEH可降低SW480细胞circRHOT1的表达量,而增加miR-29a-3p的表达量,同时敲减circRHOT1表达可通过促进miR-29a-3p表达而抑制SW480细胞的增殖、细胞克隆的形成、迁移及侵袭,而上调circRHOT1表达可通过抑制miR-29a-3p表达而降低EEEH对SW480细胞的增殖、细胞克隆的形成、迁移及侵袭的抑制作用。提示EEEH可通过抑制circRHOT1表达而促进miR-29a-3p表达,从而抑制SW480细胞的增殖及转移进而发挥抗结肠癌作用。总之,EEEH可能通过抑制circRHOT1/miR-29a-3p轴而发挥抗结肠癌作用。

本研究重点在于讨论EEEH对结肠癌细胞恶性生物学行为的影响,至于EEEH的具体成分不明确,而且EEEH是通过直接调控还是间接调控circRHOT1/miR-29a-3p轴发挥抗结肠癌作用尚需下一步研究,同时是否有其他circRNA和miRNA参与其中也需要进一步探讨。今后将收集大样本的结肠癌患者的肿瘤组织,分析circRHOT1、miR-29a-3p的表达水平以及两者的关系,并通过动物实验深入分析EEEH与circRHOT1/miR-29a-3p轴的调节作用,为结肠癌的临床治疗提供潜在靶点和治疗药物。

## [参考文献]

- [1] QI L, ZHANG Y, SONG F Y, *et al.* Chinese herbal medicine promote tissue differentiation in colorectal cancer by activating HSD11B2[J/OL]. Arch Biochem Biophys, 2020, 695: 108644-108651[2022-05-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33098869/>. DOI:10.1016/j.abb.2020.108644.
- [2] LV J, JIA Y T, LI J, *et al.* Gegen Qinlian decoction enhances the effect of PD-1 blockade in colorectal cancer with microsatellite stability by remodelling the gut microbiota and the tumour microenvironment[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 415-429. DOI: 10.1038/s41419-019-1638-6.
- [3] DAI G L, SUN B T, GONG T, *et al.* Ginsenoside Rb2 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells by suppressing TGF- $\beta$ /Smad signaling[J/OL]. Phytomedicine, 2019, 56: 126-135[2022-05-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30668333/>. DOI:10.1016/j.phymed.2018.10.025.
- [4] WANG R, LIU H W, SHAO Y Y, *et al.* Sophoridine inhibits human colorectal cancer progression via targeting MAPKAPK2[J]. Mol Cancer Res, 2019, 17(12): 2469-2479. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-19-0553.
- [5] 江涛,周兵,付丹,等.地锦草对Hela细胞增殖与凋亡的影响[J].中国现代中药, 2017, 19(12): 1713-1716, 1727. DOI:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.12.011.
- [6] WANG L Y, LONG H Y, ZHENG Q H, *et al.* Circular RNA circRHOT1 promotes hepatocellular carcinoma progression by initiation of NR2F6 expression[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 119-130. DOI:10.1186/s12943-019-1046-7.
- [7] ZHENG Z L, CUI H T, WANG Y, *et al.* Downregulation of RPS15A by miR-29a-3p attenuates cell proliferation in colorectal carcinoma [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2019, 83(11): 2057-2064. DOI: 10.1080/09168451.2019.1637712.
- [8] 王耀杰,相晓晗,韩丽娜,等.中药地锦草乙醇提取物体外抑制胃癌细胞增殖活性及机制研究[J].癌变·畸变·突变, 2020, 32(3): 187-193. DOI:10.3969/j.issn.1004-616x.2020.03.006.
- [9] SUI H, ZHAO J H, ZHOU L H, *et al.* Tanshinone II A inhibits  $\beta$ -catenin/VEGF-mediated angiogenesis by targeting TGF- $\beta$ 1 in normoxic and HIF-1  $\alpha$  in hypoxic microenvironments in human colorectal cancer [J/OL]. Cancer Lett, 2017, 403: 86-97[2022-05-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28602978/>. DOI:10.1016/j.canlet.2017.05.013.
- [10] WANG X Y, ZHANG H Y, YANG H O, *et al.* Exosome-delivered circRNA promotes glycolysis to induce chemoresistance through the miR-122-PKM2 axis in colorectal cancer[J]. Mol Oncol, 2020, 14(3): 539-555. DOI:10.1002/1878-0261.12629.
- [11] XU H C, LIU Y J, CHENG P Q, *et al.* CircRNA\_0000392 promotes colorectal cancer progression through the miR-193a-5p/PIK3R3/AKT axis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 283-299. DOI: 10.1186/s13046-020-01799-1.
- [12] 胡建新,席晓甜,王晓敏,等.地锦草调控NF- $\kappa$ B/VEGF信号通路抑制肿瘤血管生成的机制[J].中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 165-170. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20182027.
- [13] SHIN S Y, KIM C G, JUNG Y J, *et al.* Euphorbia humifusa Willd exerts inhibition of breast cancer cell invasion and metastasis through inhibition of TNF $\alpha$ -induced MMP-9 expression[J]. BMC Complementary Altern Med, 2016, 16(1): 413-423. DOI: 10.1186/s12906-016-1404-6.
- [14] GU Y, YU J J, DING C, *et al.* Flavonoid GL-V9 suppresses invasion and migration of human colorectal cancer cells by inhibiting PI3K/Akt and MMP-2/9 signaling[J]. J Cancer, 2021, 12(15): 4542-4551. DOI:10.7150/jca.58710.
- [15] LING S K, HE Y R, LI X X, *et al.* CircRHOT1 mediated cell proliferation, apoptosis and invasion of pancreatic cancer cells by sponging miR-125a-3p[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(17): 9881-9889. DOI:10.1111/jcmm.15572.
- [16] QU S B, HAO X K, SONG W J, *et al.* Circular RNA circRHOT1 is upregulated and promotes cell proliferation and invasion in pancreatic cancer[J]. Epigenomics, 2019, 11(1): 53-63. DOI:10.2217/epi-2018-0051.
- [17] ZHAO B Y, SONG X D, GUAN H H. circACAP2 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting miR-29a/b-3p-COL5A1 axis[J/OL]. Life Sci, 2020, 244: 117179-117186[2022-05-8]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31863774/>. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117179.
- [18] KONG Z, WAN X C, LU Y L, *et al.* Circular RNA circFOXO3 promotes prostate cancer progression through sponging miR-29a-3p[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(1): 799-813. DOI:10.1111/jcmm.14791.

[收稿日期] 2022-03-27

[修回日期] 2022-07-16

[本文编辑] 向正华,沈志超