

·论著·

# 青藤碱调控 LncRNA-HEIH 表达抑制人食管癌细胞迁移和侵袭

陈中凯,伍贤权,敬家辉,龙春晖,李 龙,陈伟毅

(湖南医药学院医学院,湖南 怀化 418000)

**摘要:**目的 探讨青藤碱(SIN)对食管癌细胞迁移、侵袭的影响及对 LncRNA-HEIH 的调控作用。方法 采用不同浓度青藤碱处理食管癌 TE-1 细胞,si-NC、si-HEIH 分别转染 TE-1 细胞,pcDNA、pcDNA-HEIH 分别转染 TE-1 细胞后加入青藤碱处理细胞;CCK8 检测细胞活力,划痕实验检测细胞迁移率,Transwell 实验检测侵袭细胞数,qRT-PCR 检测 HEIH 表达量。结果 青藤碱 25、50、100 mg/L 对 TE-1 细胞活力无明显影响( $P>0.05$ ),在青藤碱 25、50、100 mg/L 的作用下,TE-1 细胞迁移率和侵袭细胞数显著降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),在青藤碱 25、50、100 mg/L 的作用下,TE-1 细胞 HEIH 表达显著降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。转染 si-HEIH 可显著降低 TE-1 细胞迁移率和侵袭细胞数,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),过表达 HEIH 可显著逆转青藤碱降低 TE-1 细胞迁移率和侵袭细胞数的作用( $P<0.01$ )。结论 青藤碱通过抑制 HEIH 表达,抑制食管癌细胞迁移和侵袭。

**关键词:**青藤碱;HEIH;迁移;侵袭;食管癌

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2024.19.010

文章编号:1006-1959(2024)19-0062-06

## Sinomenine Inhibits Migration and Invasion of Human Esophageal Cancer Cells by Regulating LncRNA-HEIH Expression

CHEN Zhongkai,WU Xianquan,JING Jiahui,LONG Chunhui,LI Long,CHEN Weiyi

(Medical School of Hunan University of Medicine,Huaihua 418000,Hunan,China)

**Abstract:**Objective To investigate the effect of sinomenine (SIN) on the migration and invasion of esophageal cancer cells and the regulation of LncRNA-HEIH.Methods Esophageal cancer TE-1 cells were treated with different concentrations of sinomenine. TE-1 cells were transfected with si-NC and si-HEIH, respectively. TE-1 cells were transfected with pcDNA and pcDNA-HEIH, respectively, and then treated with sinomenine. CCK8 was used to detect cell viability, scratch test was used to detect cell migration rate, Transwell test was used to detect the number of invasive cells, and qRT-PCR was used to detect HEIH expression.Results Sinomenine 25, 50 and 100 mg/L had no significant effect on the viability of TE-1 cells ( $P>0.05$ ). Under the action of sinomenine 25, 50 and 100 mg/L, the migration rate and invasive cell number of TE-1 cells decreased significantly ( $P<0.01$ ). Under the action of sinomenine 25, 50 and 100 mg/L, the expression of HEIH in TE-1 cells decreased significantly ( $P<0.01$ ). Transfection of si-HEIH significantly reduced the migration rate and the number of invasive cells of TE-1 cells ( $P<0.01$ ). Overexpression of HEIH significantly reversed the effect of sinomenine on reducing the migration rate and the number of invasive cells of TE-1 cells ( $P<0.01$ ).Conclusion Sinomenine inhibits the migration and invasion of esophageal cancer cells by inhibiting the expression of HEIH.

**Key words:**Sinomenine;HEIH;Migration;Invasion;Esophageal cancer

食管癌是指发生在食管上皮组织中的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。根据全球癌症数据统计,食管癌是全球第 8 常见的恶性肿瘤,也是全球第 6 常见的癌症死因<sup>[2]</sup>。我国是世界上食管癌高发地之一,每年有 16 万~20 万人死于食管癌<sup>[3]</sup>。尽管已有手术、化疗、放疗等多种方法

用于食管癌治疗,但患者的预后及整体生存率仍然较差,其主要原因是食管癌容易发生转移<sup>[4]</sup>,导致肿瘤扩散,从而导致患者预后差<sup>[5]</sup>。因此,积极寻找新的抗食管癌转移药物,对于改善患者预后具有重要意义<sup>[6]</sup>。青藤碱(Sinomenine, SIN)为防己科防己属植

基金项目:1.国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:202212214009);2.2022 年度湖南省大学生创新创业训练计划项目(编号:5021);3.湖南省自然科学基金项目(编号:2022JJ50290);4.湖南省卫生健康委科研课题(编号:202104081483)

作者简介:陈中凯(2001.10-),男,湖南怀化人,本科,主要从事中药抗肿瘤药理研究

通讯作者:陈伟毅(1986.1-),男,湖南衡阳人,硕士,讲师,主要从事消化系统肿瘤防治研究

物青风藤及毛青藤的干燥藤茎中提取的生物碱单体,具有抗炎、镇痛、镇静、抗心律失常、抗血管新生等作用,临床上主要用于治疗心律失常和类风湿性关节炎等疾病<sup>[7]</sup>。近来研究报道<sup>[8]</sup>,青藤碱具有良好的抗肿瘤作用,可以抑制多种肿瘤细胞转移,但青藤碱对食管癌的作用尚未清楚。本研究拟探讨青藤碱对食管癌细胞迁移和侵袭的作用及其机制,旨在为将青藤碱开发为抗食管癌转移的新型药物提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 仪器 Axio Observer 型倒置显微镜(德国蔡司公司),Forma Steri-Cycle 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国赛默飞公司),EPOCH 酶标仪(美国 BioTek 公司),Light-Cycler480 II 荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

1.2 试剂 青藤碱(北京索莱宝科技有限公司,批号:SS8560);4%多聚甲醛、结晶紫染色液、CCK8 试剂(碧云天生物科技有限公司,批号分别为:P0099、C0121、C0038);Matrigel 基底胶(美国 BD 公司,批号:356234);Transwell 小室(美国 Corning 公司,批号:3422);TRIzol 试剂盒、Lipofetmiane 2000(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒、SYBR Green 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);si-NC、si-HEIH、pcDNA、pcDNA-HEIH 购自广州锐博生物科技有限公司;RPMI 1640(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号:22400071);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号:11011-8611)。

1.3 细胞 人食管癌 TE-1 细胞(中科院典型培养物保藏委员会细胞库,批号:TCHu 89)。

## 1.4 方法

1.4.1 细胞培养及实验分组 人食管癌 TE-1 细胞用含 10%的胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中,每隔 2~3 d 消化传代后开展实验。将正常培养的 TE-1 细胞作为对照组,将 TE-1 细胞接种于含 25、50、100 mg/L 青藤碱的培养液中分别标记为青藤碱 25、50、100 mg/L 组,将 si-NC、si-HEIH 分别转染 TE-1 细胞后标记为 si-NC 组、si-HEIH 组,将 pcDNA、pcDNA-HEIH 分别转染 TE-1 细胞后加入含 100 mg/L 青藤碱的培养液标记为青藤碱 100 mg/L+pcDNA 组、青藤碱 100 mg/L+pcDNA-HEIH 组。

1.4.2 CCK8 检测细胞活力 将 TE-1 细胞以每孔

1×10<sup>5</sup>/ml,100 μl/孔接种在 96 孔板中,待细胞贴壁后根据实验分组予以相应处理 24 h 后,每孔加入 10 μl CCK8 试剂继续培养 1 h,用酶标仪检测各孔在 450 nm 处的吸光度(OD 值),并计算细胞活力=(实验组 OD 值-对照组 OD 值)/对照组 OD 值×100%。

1.4.3 划痕实验检测细胞迁移率 将 TE-1 细胞以每孔 1×10<sup>5</sup>/ml,2.5 ml/孔接种在 6 孔板中,当细胞生长到板底 90%时,用 10 μl 的 Tip 头在板底划痕,之后根据实验分组予以相应处理,并加入含 1%血清的培养液继续培养,分别在 0、24 h 对划痕区域进行拍照,采用 Image J 软件测量划痕距离,并计算细胞迁移率=(0 h 划痕距离-24 h 划痕距离)/0 h 划痕距离×100%。

1.4.4 Transwell 实验检测侵袭细胞数 将无血清培养液与 Matrigel 基质胶按 1:8 比例混合,平铺于小室上室中,待其凝固后,用胰酶消化 TE-1 细胞,无血清培养液重悬成 1×10<sup>5</sup>/ml 的单细胞悬液,取 200 μl 加入小室上室中,小室下室加入 800 μl 含 20%血清的培养液并根据实验分组予以相应处理,继续培养 24 h,取出小室,去除培养液,用 4%多聚甲醛固定,结晶紫染色,用棉签擦去未穿过的细胞,显微镜下拍照并计算细胞数。

1.4.5 qRT-PCR 检测细胞 HEIH 表达 Trizol 法提取细胞总 RNA,分光光度计检测 RNA 浓度。根据 TaKaRa 公司的逆转录试剂盒说明书将 RNA 进行逆转录反应得到 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 扩增目的基因,反应体系:SYBR Green Master Mix 10 μl、上下游引物各 1 μl、cDNA 模板 2 μl、ddH<sub>2</sub>O 补足体系至 20 μl。反应条件:95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 HEIH 相对表达量。HEIH 上游引物:5'-ATGCGA-GAAGCCATGAGACC-3',HEIH 下游引物:5'-GGAACAGCTTGTGTGACCGA-3',GAPDH 上游引物:5'-CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3',GAPDH 下游引物:5'-GACTCCGACCTTCACCTTCC-3'。

1.5 数据处理 采用 SPSS 28.0 软件进行统计分析,实验数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett-t 检验或 Q 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 青藤碱对 TE-1 细胞的毒性作用** 与对照组相比,青藤碱 25、50、100 mg/L 组细胞活力无显著改变 ( $P>0.05$ ) (图 1), 表明青藤碱 25、50、100 mg/L 对 TE-1 细胞无毒性作用,因此用于后续实验。

**2.2 青藤碱对 TE-1 细胞迁移、侵袭的影响** 与对照组相比,青藤碱 25、50、100 mg/L 组细胞迁移率、侵袭细胞数显著降低 ( $P<0.01$ ),见图 2A~图 2D,表明青藤碱可以抑制 TE-1 细胞迁移和侵袭。

**2.3 青藤碱对 HEIH 的影响** 与对照组相比,青藤碱 25、50、100 mg/L 组 HEIH 表达量显著降低 ( $P<0.01$ ),见图 3,表明青藤碱可以抑制 TE-1 细胞 HEIH 表达。

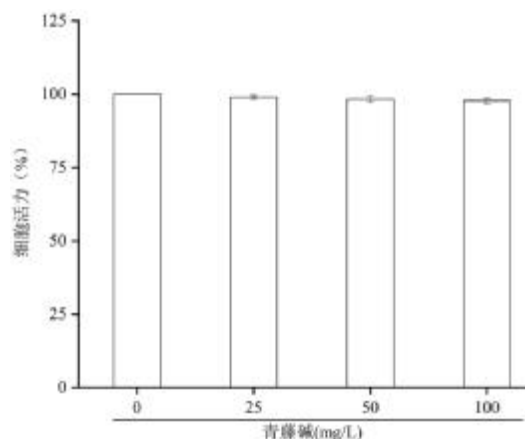
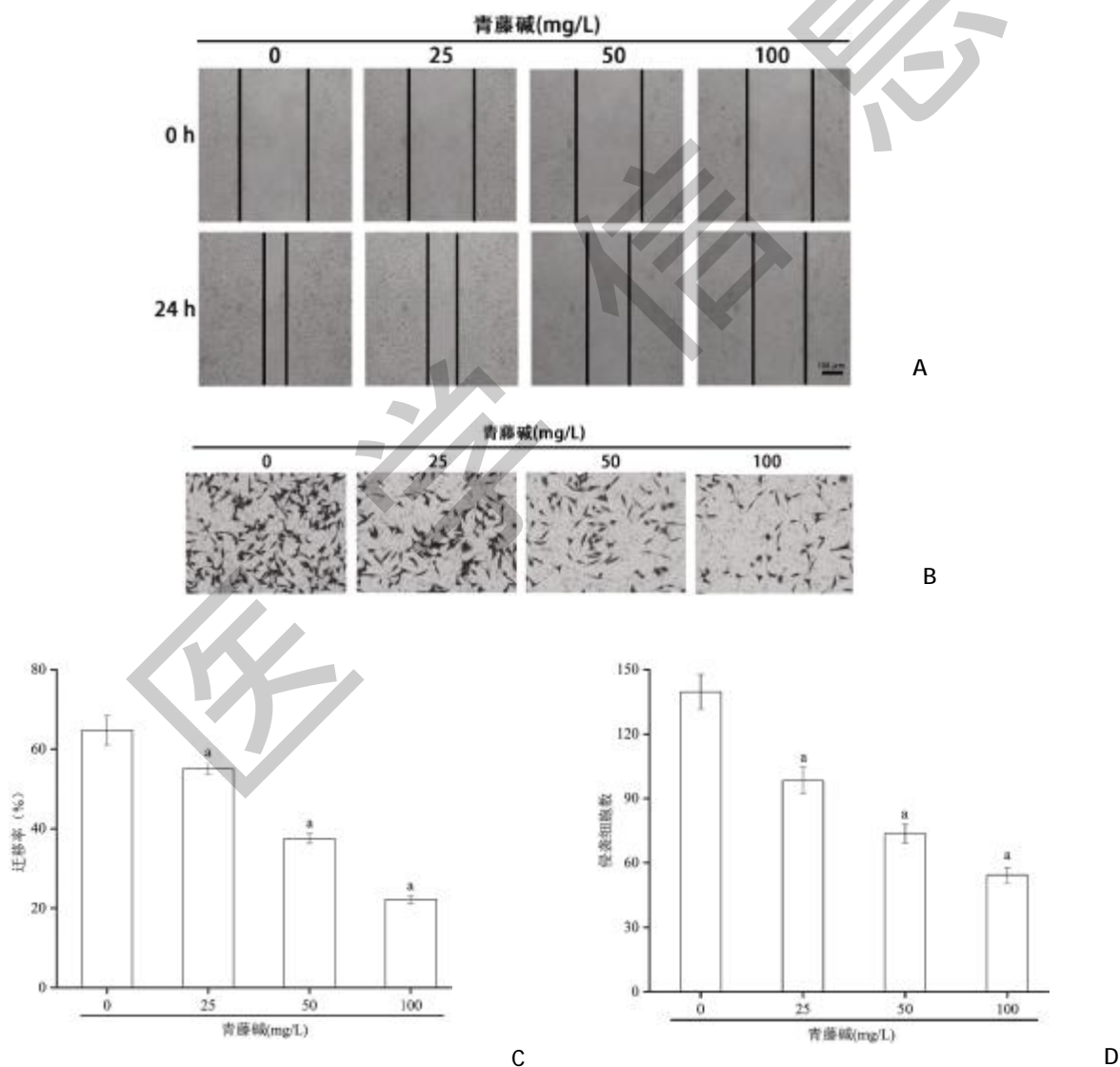
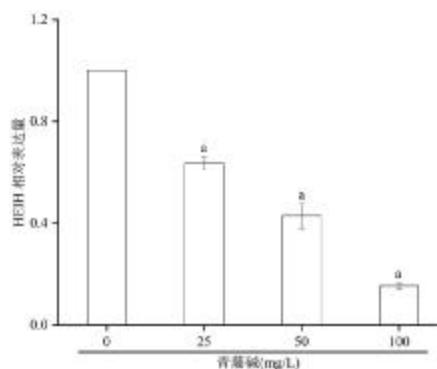


图 1 青藤碱对 TE-1 细胞活力的影响



注:A、B:青藤碱对细胞迁移的影响;C、D:青藤碱对细胞侵袭的影响;与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ 。

图 2 青藤碱对 TE-1 细胞迁移和侵袭的影响



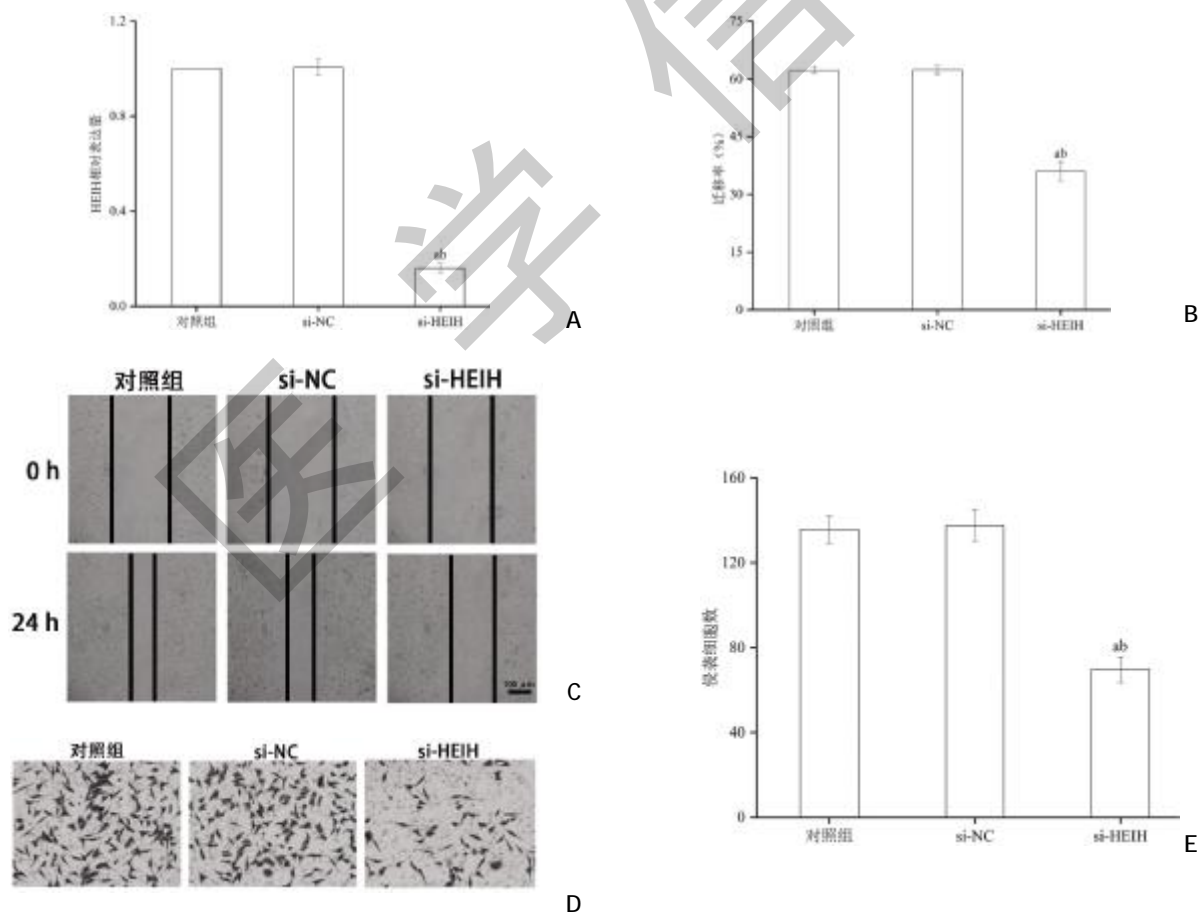
注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ 。

图 3 青藤碱对 TE-1 细胞 HEIH 表达的影响

**2.4 HEIH 对 TE-1 细胞迁移和侵袭的影响** si-NC 组 HEIH 表达量与对照组相比无统计学差异, si-HEIH 组 HEIH 表达量低于对照组和 si-NC 组 (图 4A), 表明沉默 HEIH 可以下调 TE-1 细胞 HEIH 表达。si-NC 组细胞迁移率和侵袭细胞数与对照组相比无统计学差异; si-HEIH 组细胞迁移率 (图 4B、图 4C) 和侵袭细胞数 (图 4D、图 4E) 低于对照组和

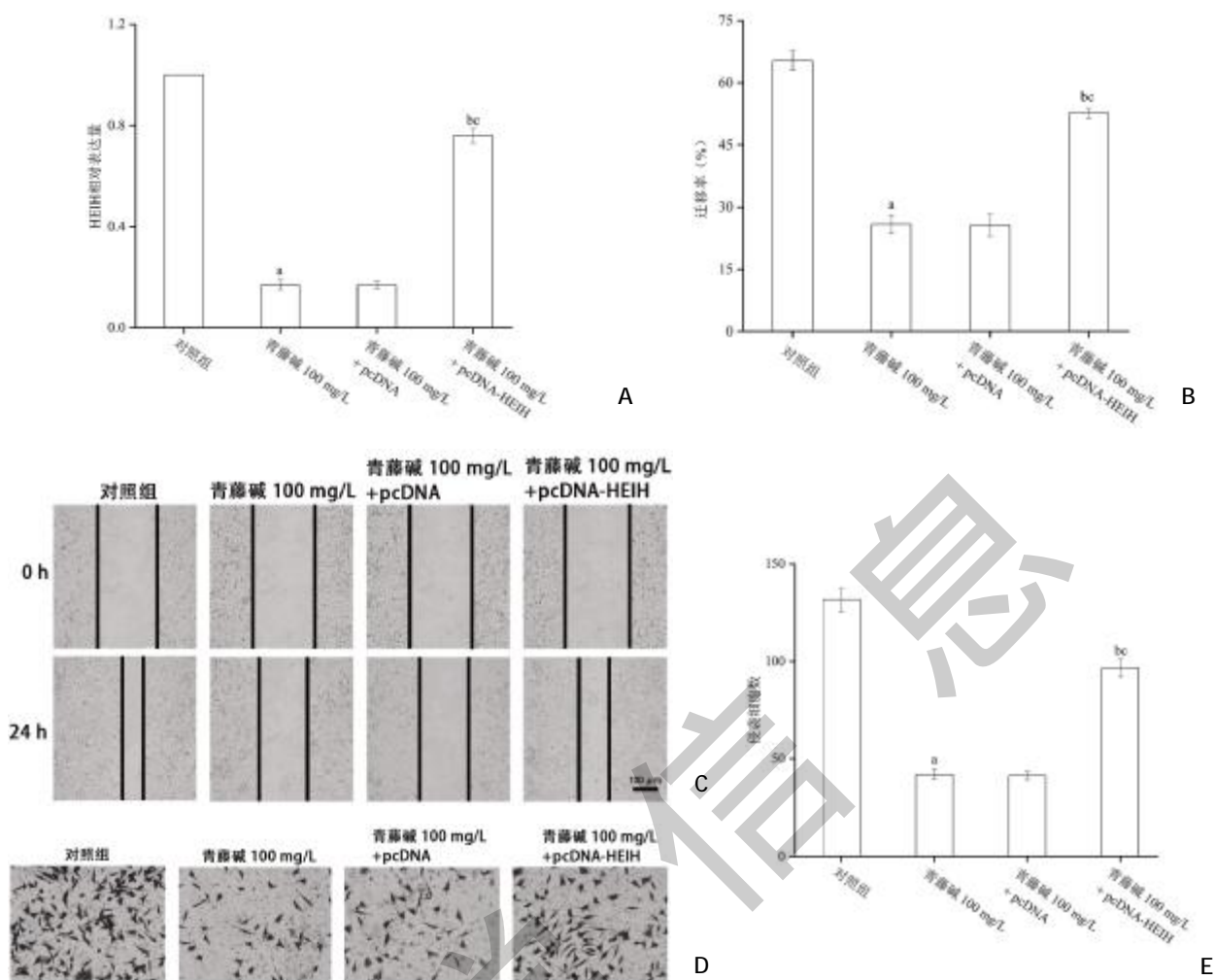
si-NC 组 ( $P<0.01$ ), 表明下调 HEIH 表达可以抑制 TE-1 细胞迁移和侵袭。

**2.5 过表达 HEIH 逆转青藤碱对 TE-1 细胞迁移和侵袭的影响** 青藤碱 100 mg/L 组 HEIH 表达量低于对照组 ( $P<0.01$ ), 青藤碱 100 mg/L 组 HEIH 表达量与青藤碱 100 mg/L+pcDNA 组相比无统计学差异; 青藤碱 100 mg/L+pcDNA-HEIH 组 HEIH 表达量高于青藤碱 100 mg/L 组和青藤碱 100 mg/L+pcDNA 组 ( $P<0.01$ ), 表明过表达 HEIH 可以逆转青藤碱抑制 TE-1 细胞 HEIH 表达的作用 (图 5A)。青藤碱 100 mg/L 组细胞迁移率和侵袭细胞数低于对照组 ( $P<0.01$ ); 青藤碱 100 mg/L 组细胞迁移率和侵袭细胞数与青藤碱 100 mg/L+pcDNA 组相比无统计学差异, 青藤碱 100 mg/L+pcDNA-HEIH 组细胞迁移率和侵袭细胞数高于青藤碱 100 mg/L 组和青藤碱 100 mg/L+pcDNA 组 ( $P<0.01$ ), 表明过表达 HEIH 可以逆转青藤碱对 TE-1 细胞迁移和侵袭的作用 (图 5B~图 5E)。



注:A:siRNA 沉默对 HEIH 表达的影响;B、C:HEIH 对细胞迁移的影响;D、E:HEIH 对细胞侵袭的影响;与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与 si-NC 组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

图 4 HEIH 对 TE-1 细胞迁移和侵袭的影响



注:A:过表达 HEIH 对青藤碱抑制 HEIH 表达作用的影响;B、C:过表达 HEIH 对青藤碱抑制细胞迁移作用的影响;D、E:过表达 HEIH 对青藤碱抑制细胞侵袭作用的影响。与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与青藤碱 100 mg/L 组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与青藤碱 100 mg/L+pcDNA 组比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ 。

图 5 HEIH 逆转青藤碱对 TE-1 细胞迁移和侵袭的作用

### 3 讨论

食管癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一。我国是世界上食管癌发病率最高的国家,尽管已有手术、化疗等多种方法用于治疗食管癌,但由于食管癌早期容易发生转移引起肿瘤扩散,因此大部分患者预后较差<sup>[9]</sup>。目前,急需开发新的抗食管癌转移药物来改善患者预后。青藤碱是从青风藤及毛青藤的干燥藤茎中提取的一种生物碱,近年研究发现青藤碱可以抑制肝癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞转移<sup>[10-12]</sup>。本研究发现青藤碱可以显著降低食管癌细胞迁移率和侵袭细胞数,表明青藤碱可以抑制食管癌细胞转移,是一种潜在的抗食管癌转移药物,与上述研究一致。

近年来研究发现长链非编码 RNA HEIH 在多种

肿瘤组织中呈过度表达,如肝癌、胃癌、乳腺癌等<sup>[13-15]</sup>。有文献报道 HEIH 在食管癌组织中呈高表达,其表达水平与生存时间、肿瘤分级和 TNM 分期等临床病理特征相关<sup>[16]</sup>。同时有报道显示<sup>[17]</sup>,高表达 HEIH 食管癌患者预后明显差于低表达患者。本研究发现,采用 siRNA 技术沉默食管癌细胞 HEIH 表达后,细胞迁移率和侵袭细胞数明显下降,表明沉默 HEIH 可以抑制食管癌细胞迁移和侵袭。

多项研究表明,青藤碱可以通过调控非编码 RNA 起到抗肿瘤作用<sup>[18-20]</sup>。本研究发现,在青藤碱的作用下,HEIH 表达显著下降,同时食管癌细胞迁移和侵袭受到明显抑制,而过表达 HEIH 可以逆转青藤碱抑制食管癌细胞迁移和侵袭的作用,表明青藤

碱通过调控 HEIH 表达起到抗食管癌作用。

综上所述,青藤碱通过调控 HEIH 表达抑制食管癌细胞迁移和侵袭,是一种潜在的新型的抗食管癌转移药物。青藤碱作为一种中药材提取的生物碱,具有来源广泛、价格低廉、毒副作用小等优点,因此其临床应用前景非常广阔。然而,本研究也有一些不足之处,比如,没有开展动物实验及临床实验验证青藤碱对食管癌的作用,青藤碱调控 HEIH 表达的具体机制等,还需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1]宋春涛,于永洋,高振,等.局部晚期食管癌免疫治疗的现状及前景[J].实用肿瘤杂志,2023,38(2):195-201.
- [2]Huang J,Koulaouzidis A,Marlicz W,et al.Global Burden,Risk Factors,and Trends of Esophageal Cancer: An Analysis of Cancer Registries from 48 Countries[J].Cancers (Basel),2021,13(1):141.
- [3]He Y,Li D,Shan B,et al.Incidence and mortality of esophagus cancer in China,2008-2012 [J].Chin J Cancer Res,2019,31(3):426-434.
- [4]Verstegen MH,Harker M,van de Water C,et al.Metastatic pattern in esophageal and gastric cancer: Influenced by site and histology[J].World J Gastroenterol,2020,26(39):6037-6046.
- [5]Zhang J,Ma W,Wu H,et al.Analysis of Homogeneous and Heterogeneous Factors for Bone Metastasis in Esophageal Cancer[J].Med Sci Monit,2019,25:9416-9425.
- [6]齐冉,杜桂平,刘旭婷,等.帕博利珠单抗联合化疗一线治疗晚期或转移性食管癌的成本-效用分析[J].中国药房,2022,33(12):1466-1473.
- [7]陈伟毅,秦春宏,陈延,等.青藤碱通过调控 PI3K/AKT 通路介导的上皮间质转化抑制胰腺癌 As PC-1 细胞侵袭和转移[J].中国现代应用药学,2022,39(11):1419-1425.
- [8]陈伟毅,洪炼哲,彭靖,等.青藤碱抑制胰腺癌细胞迁移和侵袭及其与 NF- $\kappa$ B 信号通路的关系[J].中国普通外科杂志,2022,31(3):359-368.
- [9]周梓婷,颜建业,郑智弦,等.食管癌患者血清中 circAGFG1 表达与预后的相关性[J].临床检验杂志,2023,41(3):200-203.
- [10]Luo Y,Liu L,Zhao J,et al.PI3K/AKT1 Signaling Pathway Mediates Sinomenine-Induced Hepatocellular Carcinoma Cells Apoptosis:An in Vitro and in Vivo Study [J].Biol Pharm Bull,2022,45(5):614-624.
- [11]陈伟毅,陈延,唐峰.青藤碱通过 COX-2/VEGF 通路抑制胃癌 MGC803 细胞迁移和侵袭的研究[J].中国药师,2020,23(12):2337-2342.
- [12]张慧敏,刘晓旭,谢佩玲,等.盐酸青藤碱通过抑制 bFGF 介导的乳腺癌血管新生发挥抑瘤作用[J].西安交通大学学报(医学版),2021,42(6):947-952.
- [13]刘美伟,高楠,黄蕾,等.LncRNA-HEIH、GP73、AFP 在原发性肝癌中的表达及与临床病理特征的关系[J].检验医学与临床,2022,19(11):1510-1513.
- [14]Yang YJ,Luo S,Wang LS.Effects of lncRNA-HEIH on proliferation,apoptosis and invasion of gastric cancer cells[J].Eur Rev Med Pharmacol Sci,2020,24(18):9400-9407.
- [15]Chen C,Gu C,Ren Q,et al.lncRNA HEIH,an indicator of high malignancy and poor prognosis,functions as an oncogene in breast cancer[J].Mol Med Rep,2020,22(4):2869-2877.
- [16]Wang D,You D,Pan Y,et al.Downregulation of lncRNA-HEIH curbs esophageal squamous cell carcinoma progression by modulating miR-4458/PBX3 [J].Thorac Cancer,2020,11(7):1963-1971.
- [17]Ding X,Qi C,Min J,et al.Long non-coding RNA HEIH suppresses the expression of TP53 through enhancer of zeste homolog 2 in oesophageal squamous cell carcinoma [J].J Cell Mol Med,2020,24(18):10551-10559.
- [18]Xu Y,Jiang T,Wang C,et al.Sinomenine hydrochloride exerts antitumor outcome in ovarian cancer cells by inhibition of long non-coding RNA HOST2 expression [J].Artif Cells Nanomed Biotechnol,2019,47(1):4131-4138.
- [19]Shen KH,Hung JH,Liao YC,et al.Sinomenine Inhibits Migration and Invasion of Human Lung Cancer Cell through Downregulating Expression of miR-21 and MMPs[J].Int J Mol Sci,2020,21(9):3080.
- [20]Gao G,Liang X,Ma W.Sinomenine restrains breast cancer cells proliferation,migration and invasion via modulation of miR-29/PDCD-4 axis [J].Artif Cells Nanomed Biotechnol,2019,47(1):3839-3846.

收稿日期:2023-09-16;修回日期:2023-09-30

编辑/肖婷婷