片仔癀对 LncRNA-ANRIL 介导大肠癌淋巴管新生的影响

逯 遥^{1,2,3}, 张 敏¹, 刘 洁¹, 毛倩倩¹, 曹治云^{1,2,3}, 林久茂^{1,2,3*}

1 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350122;

2 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122;

3 中西医结合基础福建省高等学校重点实验室(福建中医药大学), 福建 福州 350122

* 通信作者: 林久茂, E-mail: linjiu-mao@fjtcu.edu.cn

收稿日期: 2020-06-19; 接受日期: 2020-07-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(81774121)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.05008

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

摘要 目的:研究片仔癀(PZH)体外对长链非编码 RNA-ANRIL(LncRNA-ANRIL)介导大肠癌淋巴管新生的抑制作用及其机制。**方法:**将体外培养人大肠癌细胞 HCT-116 用 PZH 进行干预,分为对照组和 PZH 干预组(0.25、0.50、0.75 mg/mL),采用 CCK-8 实验检测细胞活力,用 RT-qPCR 检测 LncRNA-ANRIL 的表达,用 Western blot 法检测促淋巴管新生因子 VEGF-C 蛋白表达;用 Lipofectamine RNAiMAX 转染 HCT-116 细胞,分为 Si-NC 组和 Si-ANRIL 组,采用 RT-qPCR 法检测 LncRNA-ANRIL 的表达,在倒置显微镜下观察细胞形态变化,用 CCK-8 实验检测细胞活力,Western blot 检测促淋巴管新生因子 VEGF-C 蛋白表达;分别以 Si-NC、Si-ANRIL 和 Si-NC+PZH(0.25 mg/mL)干预 HCT-116 细胞并收集细胞培养上清液即肿瘤培养上清(TSNs)用于培养人淋巴内皮细胞(HLEC),采用 CCK-8 实验检测细胞活力,Transwell 实验观察细胞迁移能力和细胞侵袭能力,管腔形成实验观察细胞管腔形成能力。**结果:**不同浓度 PZH 干预 HCT-116 细胞均可显著抑制其活力($P<0.01$),下调 LncRNA-ANRIL 表达($P<0.01$)和 VEGF-C 蛋白表达,呈浓度依赖性;在 HCT-116 细胞中沉默 LncRNA-ANRIL 的表达,与 Si-NC 组比较, Si-ANRIL 组 LncRNA-ANRIL 表达显著降低($P<0.05$),且可降低细胞密度、细胞活力($P<0.01$)和 VEGF-C 蛋白表达;收集的 TSNs 上清干预 HLEC 后,与 Si-NC 组比较, Si-ANRIL 和 Si-NC+PZH(0.25 mg/mL)组可显著降低 HLEC 活力、迁移能力、侵袭能力和管腔形成能力($P<0.01$)。**结论:**PZH 可抑制大肠癌细胞 LncRNA-ANRIL 表达及其介导的大肠癌淋巴管新生, LncRNA-ANRIL 是 PZH 抑制大肠癌淋巴管新生的作用靶点之一。

关键词 大肠癌;片仔癀;人淋巴内皮细胞;LncRNA-ANRIL;淋巴管新生

大肠癌(colorectal cancer, CRC)包括结、直肠癌,是最常见的消化道恶性肿瘤之一。据美国癌症协会的最新统计数据,全球每年新增大肠癌发病例数接近 109.6 万,且造成超过 50%(>50 万)患者的死亡^[1],造成大肠癌高死亡率的原因是大多数患者在诊断时已是晚期且伴有转移不适合手术。淋巴转移是大肠癌最常见和最早出现的转移方式,大肠癌淋巴管新生是其淋巴转移及其复发的主要因

素和机制^[2],其发生机制涉及多个癌基因和抑癌基因的表达及长链非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA)表观遗传学调控等,是一个多基因、多途径、多步骤的协同积累过程^[3]。血管内皮生长因子-C(VEGF-C)是目前公认最主要的促淋巴血管生成因子,而抑制大肠癌细胞 VEGF-C 的表达,可抑制其淋巴管新生,进而防止大肠癌细胞的转移^[4-5]。长链非编码 RNA-ANRIL(LncRNA-ANRIL)是长度为

引用格式:逯遥,张敏,刘洁,等. 片仔癀对 LncRNA-ANRIL 介导大肠癌淋巴管新生的影响[J]. 康复学报, 2020, 30(5): 387-394.

LU Y, ZHANG M, LIU J, et al. Effect of Pien Tze Huang on lymphangiogenesis mediated by LncRNA-ANRIL in colorectal cancer [J]. Rehabilitation Medicine, 2020, 30(5): 387-394.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.05008

3.8 kb 的一种 LncRNA,与肿瘤的发生、发展及转移密切相关^[6]。最新研究表明,在结直肠癌患者中 LncRNA-ANRIL 显著过表达,且 ANRIL 高表达患者的 5 年生存率明显低于 ANRIL 低表达患者,有趣的是还发现 ANRIL 高表达的患者也有较高的 VEGF-C 表达,因此推测 LncRNA-ANRIL 可通过调控促淋巴管新生关键因子 VEGF-C 的表达促进大肠癌淋巴管新生,从而导致大肠癌淋巴管转移^[3]。

片仔癀(Pien Tze Huang,PZH)对多种恶性肿瘤的临床疗效显著,且无明显毒副作用^[7]。实验研究发现 PZH 可通过抑制 VEGF-C 信号通路抑制大肠癌淋巴管新生,同时通过调控多条信号通路,诱导大肠癌细胞凋亡,抑制大肠癌细胞增殖、转移和血管新生等^[4,8-10],但其作用机制仍未阐明,以及未见从 LncRNA-ANRIL 方面探讨 PZH 抑制肿瘤淋巴管新生的报道。因此,本文在此基础上研究 PZH 抑制 LncRNA-ANRIL 介导大肠癌淋巴管新生的作用机制。

1 实验材料

1.1 药物和细胞株

PZH 由漳州片仔癀药业股份有限公司提供(批号:1808087);人大肠癌 HCT-116 细胞,购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;人淋巴内皮细胞(HLEC),购自广州吉尼欧生物科技有限公司,细胞均保存于福建中医药大学中西医结合研究院医学实验中心液氮中。

1.2 实验试剂

RPMI1640 培养基(批号:C11875500BT)、胎牛血清(FBS,批号:10099141)、0.25% EDTA-胰酶(批号:25200072),购自美国 Life 公司;青-链霉素混合液(双抗,批号:sv30010)、磷酸盐缓冲液(PBS,批号:SH30256.01B),购自美国 Hyclone 公司;ECM 培养基(批号:28475)、P/S 溶液(批号:27670)、ECGS(批号:27888)、FBS(批号:27849),购自 Scien Cell 生物技术公司;CCK-8(批号:k1018-1),购自美国 APEX BIO 公司;结晶紫粉末(批号:C8470),购自北京索莱宝科技有限公司;Transwell 小室(批号:3422),购自美国 Corning 公司;管腔形成试剂盒(批号:ECM625),购自德国 Merck Millipore 公司;聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白定量检测试剂盒(批号:23227)、SYBR^{TM} Select Master Mix 试剂(批号:4472908)、Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂(批号:13778-030),购自美国 Thermo 公司;Super ECL

Star(超敏化学发光检测试剂盒)(批号:S-6009),购自中国宇恒生物公司;细胞裂解液(Pierce RIPA Buffer,批号:AR0102-100),购自中国博士德生物工程有限公司;磷酸酶抑制剂(PhosStop,批号:4906837001)、蛋白酶抑制剂(Cocktail,批号:4693124001),购自瑞士 Roche 公司;苯甲基磺酰氟(PMSF,批号:ST506),购自中国碧云天生物技术有限公司;SDS-PAGE 配胶试剂盒(批号:CW0022M),购自北京康为世纪生物科技有限公司; β -actin(批号:60008-1-Ig)、GAPDH 抗体(批号:60004-1-Ig)、VEGF-C 抗体(批号:22601-1-AP)、二抗(鼠抗)(批号:SA00001-1)和二抗(兔抗)(批号:SA00001-2),均购自武汉三鹰生物技术有限公司;逆转录试剂盒(PrimeScript^{TM} RT reagent Kit with gDNA Eraser,批号:RR047A),购自宝日医生物技术(北京)有限公司;Si-NC 和 Si-ANRIL 的序列,购自上海吉玛制药有限公司。

1.3 主要仪器

CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);超净工作台(苏州净化设备公司);倒置显微镜系统(德国 Leica 仪器有限公司);Countes® 全自动细胞计数仪(美国 Life 公司);连续波长多功能酶标仪(奥地利 TECAN 公司);电泳仪、电泳槽、小型转膜仪、化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司);7500 Fast 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

2 实验方法

2.1 药物及试剂的配制

PZH 在研钵中研成细粉末后,用 PBS 配制成 25 mg/mL 溶液,超声溶解 30 min,用 0.45 μ L 孔径的滤膜过滤,经高压灭菌后于-20 $^{\circ}$ C 贮存备用。RPMI 1640 完全培养基含 10% FBS 和 1% 双抗,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。ECM 完全培养基含 5% FBS 和 1% P/S 溶液、1% ECGS,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.2 细胞培养

HCT-116 细胞用 RPMI1640 完全培养基培养,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,细胞单层贴壁生长,待细胞密度达到 80%~90% 时,加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶消化,后加入 2 mL 的完全培养基终止消化后,1 000 r/min 离心 3 min,弃上清收集沉淀细胞,用完全培养基重悬制成新细胞悬液后传代。HLEC 于 ECM 完全培养基中培养,按 1.0×10^5 个/mL 接种到 6 孔板中(2 mL/孔),此时培养基为转染后收集的肿瘤培养上清(tumor culture su-

pernatants, TSNs), 分为 Si-NC 组、Si-ANRIL 组、Si-NC+PZH(0.25 mg/L)组, 每组 3 个重复。

2.3 细胞活力检测

HCT-116 细胞按 1.5×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中(100 μ L/孔), 当细胞汇合度达到 50%~60% 时, 吸走孔中原培养基, 每孔加入 100 μ L 含有不同浓度 PZH(终浓度分别为 0、0.25、0.50、0.75 mg/mL) 的完全培养基继续培养 24 h 后, 吸弃培养基, 每孔加入 100 μ L 浓度为 0.5 mg/mL MTT 溶液继续培养 4 h 后, 吸弃 MTT 溶液, 每孔加入 100 μ L DMSO 后, 置于酶标仪(波长 570 nm)测光密度(A)值。HCT-116 细胞转染 SiRNA 36 h 后, 弃掉培养基, 按照说明书将 CCK-8 溶液加入到每孔中, 继续培养 2 h 后, 在 450 nm 波长下测 A 值。HLEC 按 1.0×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中(100 μ L/孔), 在 TSNs 中培养 24 h 后, CCK-8 检测细胞活力, 操作步骤同上, 每个浓度做 6 个复孔。

细胞活力(%) = 实验组 A 值 / 对照组 A 值 $\times$ 100%

2.4 RT-qPCR 检测 LncRNA-ANRIL 的表达

取对数生长期的 HCT-116 细胞按 1.0×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中(2 mL/孔), 待细胞汇合度达到 50%~60% 时, 将细胞分成对照组和 PZH 组, PZH 组每孔加入不同浓度 PZH(0.25、0.50、0.75 mg/mL) 溶液后, 继续培养 24 h 后, 每孔加 RNAiso Plus 1 mL 提取 RNA, 每组做 3 个复孔。NanoDrop1000 核酸检测仪对 RNA 的浓度进行测定, 应用 PrimeScript™ miRNA RT-qPCR kit 进行 Poly(A) 加尾反应和反转录反应。RT-qPCR 反应体系 10 μ L, 即 cDNA 溶液 2 μ L, SYBR™ Select Master Mix 5 μ L, PCR Forward Primer (10 μ mol/L) 0.8 μ L, DEPC 2.2 μ L, 于 7500 Fast PCR 仪进行 RNA 表达分析。通过阈值分析比较, 采用循环数(Ct)法对数据进行分析处理。定量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, GAPDH 为内参, 计算 LncRNA-ANRIL 的相对表达量。HCT-116 细胞转染 SiRNA 后检测 LncRNA-ANRIL 表达操作步骤同上。LncRNA-ANRIL 正向引物: 5'-CCGCTCCCCTATTCCCCTTA-3', 反向引物: 5'-CCTGATTGGCGGATAGAGCA-3'; GAPDH 正向引物: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAA AAT-3', 反向引物: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCA TGG-3'。

2.5 细胞转染

取对数生长期 HCT-116 细胞按 1.5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中(2 mL/孔), 培养 24 h 后, 用 Lipofectamine RNAi MAX 转染试剂沉默 LncRNA-

ANRIL 的表达, 转染体系如下: 6 孔板终体积为 1 mL, Si-NC 和 Si-ANRIL 的浓度为 50 nmol/L, 2.5 μ L/孔, 加于 6 孔板, Lipofectamine RNAi MAX 3 μ L/孔。于转染后 6 h 换成 RPMI1640 完全培养基继续培养, 转染 36 h 后做后续检测: ① 倒置显微镜对细胞的形态变化进行观察并拍照; ② RT-qPCR 检测 LncRNA-ANRIL 表达; ③ CCK-8 实验检测细胞活力; ④ Western blot 检测细胞促淋巴管新生因子 VEGF-C 蛋白表达。Si-NC 序列: 正向 5'-UUCUCCGAAC GUGUCACGUTT-3', 反向 5'-ACGUGACACGUUCG GAGAATT-3'; Si-ANRIL 序列: 正向 5'-GCAUAUG UCUUUCUGGUAUTT-3', 反向 5'-AUACCAGAAA GACAUAUGCTT-3'。细胞活力检测做 6 个重复, 其余做 3 个重复。

2.6 Western blot 实验

采用 Western blot 法, 将不同浓度 PZH 干预 HCT-116 细胞 24 h 后和 HCT-116 细胞敲减 LncRNA-ANRIL 后的细胞裂解、变性, 上样量为每孔 50 μ g 蛋白, 电泳条件: 10 min 30 V、30 min 80 V、60 min 120 V, 转膜条件: 40 min 100 V。5% 的脱脂奶粉封闭 1 h 后, 加入 VEGF-C 抗体、GAPDH 抗体或 β -actin 抗体, 于 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜, 然后加入第二抗体室温孵育 1 h 后, TBST 漂洗 3 次, 用超敏化学发光检测试剂, 在 Bio-Rad 化学发光成像系统进行成像。

2.7 肿瘤培养上清的制备

HCT-116 细胞分为 Si-NC、Si-ANRIL、Si-NC+PZH 3 组, 细胞转染同前所述, 分别于转染后 6 h 换成 RPMI1640 完全培养基继续培养, 于 6 h 后再次换液, 其中 Si-NC+PZH 组更换为含 PZH 0.25 mg/mL 的培养基, 再继续孵育 24 h 后收集细胞培养上清液, 即肿瘤培养上清, 以 3 000 r/min 离心 15 min, 去除细胞碎片及杂质后用于培养 HLEC。

2.8 Transwell 小室实验检测细胞迁移和侵袭能力

① 迁移实验: HLEC 用 TSNs 干预培养 24 h 后, 吸弃各孔溶液, 分别进行消化, 用不含 FBS 的培养基重悬细胞, 按每孔 0.2 mL 含 5×10^4 个细胞种于 Transwell 上室, 下室加入 0.7 mL 完全 ECM 培养基后, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中; 9 h 后上室和下室分别用 0.2 mL 和 0.7 mL 4% 多聚甲醛固定 15 min, 吸弃 4% 多聚甲醛后, 用结晶紫染色液染色 20 min, 吸弃结晶紫, 用棉签小心擦去 Transwell 上室的细胞, 最后在倒置显微镜拍照。② 侵袭实验: 将细胞

接种至有 Matrigel 基质胶的 Transwell 上室,其余操作步骤同迁移实验操作步骤。每组均做 3 个重复迁移和侵袭实验。

2.9 管腔形成实验检测细胞管腔形成能力

预先铺好基质胶于 48 孔板中,基质胶用稀释液按照 1:9 稀释,100 μ L/孔铺胶,放于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱凝 1~2 h。HLEC 用 TSNs 干预培养 24 h 后,重新消化、离心、重悬、计数以 5×10^5 /mL 接种于预铺好的培养板中,3~5 h 拍照,随机选取 3 个视野,采集图像。每组做 3 个重复。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,所得数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示;用 Origin 2016 软件作图。数据进行正态性检验,符合正态分布且方差齐则使用单因素方差分析;方差不齐则使用秩和检验;数据不符合正态分布则使用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 不同浓度 PZH 抑制大肠癌细胞 HCT-116 的活力、LncRNA-ANRIL 及 VEGF-C 的表达

MTT 实验结果显示:与对照组比较,PZH(0.25、0.50、0.75 mg/mL)组的细胞活力明显降低($P < 0.01$)。PZH 组抑制率分别为 $(18.46 \pm 3.84)\%$ 、 $(36.43 \pm 3.49)\%$ 、 $(54.09 \pm 2.03)\%$,见图 1A。RT-qPCR 结果显示:与对照组比较,PZH 可降低 HCT-116 中 LncRNA-ANRIL 的表达($P < 0.01$),见图 1B,以上结果均呈浓度依赖性。Western blot 结果显示:与对照组比较,PZH(0.25、0.50、0.75 mg/mL)组可下调 HCT-116 细胞中 VEGF-C 的蛋白表达,见图 1C。

3.2 LncRNA-ANRIL 沉默对大肠癌细胞活力和 VEGF-C 蛋白表达的影响

HCT-116 细胞转染 SiRNA 后,RT-qPCR 检测结果显示:Si-ANRIL 组 LncRNA-ANRIL 表达 $[(0.50 \pm 0.18)\%]$ 显著低于 Si-NC 组 $[(1.07 \pm 0.34)\%]$ ($P < 0.05$),见图 2A。倒置显微镜观察结果显示:Si-ANRIL 组细胞密度明显较 Si-NC 组少,见图 2B。CCK-8 检测结果显示:Si-ANRIL 组的细胞活力显著低于 Si-NC 组 ($P < 0.01$),见图 2C。Western blot 分析结果显示,沉默 LncRNA-ANRIL 后可明显下调促淋巴管新生因子 VEGF-C 的蛋白表达,见图 2D。

注:与对照组(0 mg/mL)比较,1) $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the control group (0 mg/mL), 1) $P < 0.01$.

图 1 PZH 抑制 HCT-116 细胞活力、LncRNA-ANRIL 和 VEGF-C 蛋白的表达
Figure 1 PZH inhibited proliferation of HCT-116 cells, and expression of LncRNA-ANRIL and VEGF-C

3.3 PZH 对 LncRNA-ANRIL 介导的 HLEC 活力的影响

HLEC 培养于 TSNs 中,CCK-8 实验结果显示:与 Si-NC 组比较,Si-ANRIL 组和 Si-NC+PZH 组的细胞活力显著降低($P < 0.01$),2 组抑制率分别为 $(8.07 \pm 1.89)\%$ 和 $(10.87 \pm 4.10)\%$,见图 3。

3.4 PZH 对 LncRNA-ANRIL 介导 HLEC 迁移能力的影响

HLEC 培养于 TSNs 中,迁移实验结果显示:与 Si-NC 组比较,Si-ANRIL 组和 Si-NC+PZH 组的迁移数量显著减少,2 组的迁移率分别为 $(83.06 \pm 3.70)\%$ 、 $(71.77 \pm 8.50)\%$,见图 4。

注:与 Si-NC 组比较,1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Si-NC group, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$.

图 2 LncRNA-ANRIL 沉默抑制 HCT-116 细胞活力及 VEGF-C 蛋白表达 ($\times 200$)

Figure 2 Silencing LncRNA-ANRIL inhibits cell viability and protein expression of VEGF-C in HCT-116 cells ($\times 200$)

注:与 Si-NC 组比较,1) $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Si-NC group, 1) $P < 0.01$.

图 3 PZH 对 LncRNA-ANRIL 介导的 HLEC 活力的影响

Figure 3 Effect of PZH on LncRNA-ANRIL mediated HLEC viability

3.5 PZH 对 LncRNA-ANRIL 介导 HLEC 侵袭能力的影响

HLEC 培养于 TSNs 中,侵袭实验结果显示:与 Si-NC 组比较, Si-ANRIL 组和 Si-NC+PZH 组的侵袭数量显著减少 ($P < 0.01$), 分别为 $(67.39 \pm 5.75)\%$ 和 $(57.25 \pm 1.26)\%$, 见图 5。

3.6 PZH 对 LncRNA-ANRIL 介导 HLEC 管腔形成能力的影响

HLEC 培养于 TSNs 中,管腔形成实验结果显示:与 Si-NC 组比较, Si-ANRIL 组和 Si-NC+PZH 组的管腔形成数量显著减少 ($P < 0.01$), 见图 6。

4 讨论

大肠癌作为我国发病率第 4 位、死亡率第 5 位的恶性肿瘤,每年发病例数约 28.2 万,每年死亡病例约 13.61 万,严重危害国人生命健康^[11]。以手术为主的综合治疗是目前大肠癌治疗的主要手段,但仍有 50% 的患者在根治术 5 年内发生转移和复发^[12],其中淋巴结转移是大肠癌最常见和最早出现的转移方式,而淋巴管新生是其淋巴结转移及其复发的主要因素和机制^[2]。淋巴管新生主要指在某些病理状态时,淋巴内皮细胞受趋化因子作用而迁移至局部组织,然后在内皮生长因子作用下增殖形成新的淋巴管,包括淋巴内皮细胞迁移、增殖和管腔形成等过程^[4,13]。

LncRNA-ANRIL 与肿瘤的发生、发展及转移密切相关,在肿瘤增殖、侵袭和迁移过程中发挥重要作用,其可通过上调 VEGF-C 的表达促进大肠癌淋巴管新生,从而导致大肠癌淋巴管转移^[14-15]。如 SUN 等^[3]研究发现 LncRNA-ANRIL 在大肠癌中高表达,且其增高与淋巴结转移及预后不良密切相关;通过慢病毒转染下调 LoVo 和 HCT116 中 ANRIL 的高表达,发现细胞迁移和侵袭活性明显降低,同时也可以抑制人淋巴内皮细胞的管腔形成能力和侵袭能力;此外,在小鼠模型中,ANRIL 下调后,肿瘤生长率和肿瘤大小降低,淋巴结转移率降低,LMVD 和

注:与 Si-NC 组比较,1) $P<0.05$,2) $P<0.01$ 。

Note: Compared with the Si-NC group, 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$.

图 4 PZH 对 LncRNA-ANRIL 介导 HLEC 迁移能力的影响 (×200)

Figure 4 Effect of PZH on LncRNA-ANRIL mediated migration in HLEC (×200)

注:与 Si-NC 组比较,1) $P<0.01$ 。

Note: Compared with the Si-NC group, 1) $P<0.01$.

图 5 PZH 对 LncRNA-ANRIL 介导 HLEC 侵袭能力的影响 (×200)

Figure 5 Effect of PZH on LncRNA-ANRIL mediated invasion in HLEC (×200)

注:与 Si-NC 组比较,1) $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Si-NC group, 1) $P < 0.01$.

图 6 PZH 对 LncRNA-ANRIL 介导 HLEC 管腔形成能力的影响 ($\times 200$)

Figure 6 Effect of PZH on LncRNA-ANRIL mediated tube formation in HLEC ($\times 200$)

VEGF-C、VEGFR-3 和 LYVE-1 的表达。结果表明下调 LncRNA-ANRIL 可抑制大肠癌淋巴管生成和转移。

随着我国现代化诊疗技术的飞速发展,针对恶性肿瘤的放化疗和分子靶向药物已广泛应用于临床,但是近年来其耐药和毒副作用也日益显现,因此临床疗效确切、毒副作用小的中药复方逐渐受到国内外研究者的重视^[16]。PZH 是由三七、牛黄、蛇胆、麝香等多种名贵中药材精制而成的复方制剂,具有清热解毒、消肿散结、活血化瘀、扶正祛邪的功效;在治疗大肠癌等恶性肿瘤方面有明确的疗效,且无明显的毒副作用^[4,9-10]。本课题组前期实验研究发现 PZH 可通过抑制 VEGF-C 信号通路抑制大肠癌淋巴管新生,然而 PZH 在抑制大肠癌淋巴管新生方面的具体作用机制尚未明确。

本研究中我们用不同浓度的 PZH 干预大肠癌细胞 HCT-116,MTT 实验表明 PZH 可抑制 HCT-116 细胞的活力,RT-qPCR 显示 PZH 可显著下调 LncRNA-ANRIL 的表达,Western blot 检测结果表明 PZH 可抑制 HCT-116 细胞中促淋巴管新生关键因子 VEGF-C 蛋白的表达,以上结果提示 PZH 抗肿瘤淋巴管新生可能与调控 LncRNA-ANRIL 和 VEGF-C

的表达相关。进一步通过观察 HCT-116 细胞 LncRNA-ANRIL 沉默后对其细胞活力、形态及对促淋巴管新生关键因子 VEGF-C 蛋白表达的影响,结果显示 LncRNA-ANRIL 沉默后可显著降低 HCT-116 细胞密度、活力及 VEGF-C 蛋白表达,证实了 LncRNA-ANRIL 对 VEGF-C 表达的调控作用。在此基础上我们又收集了 HCT116 细胞 LncRNA-ANRIL 沉默和加入 PZH 后的 TSNs 对 HLEC 进行干预培养,并观察其对 HLEC 活力、迁移能力、侵袭能力和管腔形成能力的影响。研究结果显示:与 Si-NC 组比较, Si-ANRIL 组和 Si-NC+PZH 组显著抑制了 HLEC 的活力、迁移和侵袭、管腔形成能力,表明 PZH 具有抑制 LncRNA-ANRIL 介导大肠癌淋巴管新生的作用。综上所述, PZH 抑制大肠癌淋巴管转移的机制,与其抑制 LncRNA-ANRIL 表达进而降低 VEGF-C 表达,从而抑制大肠癌淋巴管新生有关。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] 肖大雷, 张绍鹏, 王大广, 等. 血清 VEGF-C 及 VEGF-D 对 T3 期大肠癌淋巴管转移作用的研究 [J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(3): 481-483.
- [3] SUN Z, OU C, REN W, et al. Downregulation of long non-cod-

- ing RNA ANRIL suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(30): 47536–47555.
- [4] 冯健愉, 靳祎祎, 严兆坤, 等. 片仔癀抑制淋巴管新生的作用及其机制研究[J]. *福建中医药*, 2016, 47(4): 43–45, 49.
- [5] HUANG C, CHEN Y. Lymphangiogenesis and colorectal cancer [J]. *Saudi Med J*, 2017, 38(3): 237–244.
- [6] HUANG X, ZHANG W Y, SHAO Z W. Association between long non-coding RNA polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(4): BSR20180365.
- [7] 黄进明. 片仔癀在肿瘤治疗中的研究进展[J]. *广东医学*, 2019, 40(18): 2694–2698.
- [8] SHEN A L, LIN W, CHEN Y Q, et al. Pien Tze Huang inhibits metastasis of human colorectal carcinoma cells via modulation of TGF- β 1/ZEB/miR-200 signaling network [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(2): 685–690.
- [9] 庄群川, 林明和, 魏丽慧, 等. 片仔癀对大肠癌细胞 Hedgehog 信号通路调控的体内外研究[J]. *康复学报*, 2018, 28(1): 31–36.
- [10] LIN J, FENG J, JIN Y, et al. Pien Tze Huang suppresses VEGF-C-mediated lymphangiogenesis in colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(6): 3568–3576.
- [11] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(1): 19–28.
- [12] LIEGES R L, MILLER K D, GODING SAUER A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(3): 145–164.
- [13] 李鹏, 申翼. 肿瘤的淋巴管生成和淋巴血管重塑[J]. *医学研究学报*, 2015, 28(6): 646–649.
- [14] LI Z, YU X, SHEN J. ANRIL: a pivotal tumor suppressor long non-coding RNA in human cancers [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(5): 5657–5661.
- [15] WANG H, LIU Y, ZHONG J, et al. Long noncoding RNA ANRIL as a novel biomarker of lymph node metastasis and prognosis in human cancer: a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(18): 14608–14618.
- [16] 刘艳娜. 中药毒副作用的预防对策及药理分析[J]. *中西医结合研究*, 2019, 11(6): 322–324.

Effect of Pien Tze Huang on Lymphangiogenesis Mediated by LncRNA-ANRIL in Colorectal Cancer

LU Yao^{1,2,3}, ZHANG Min¹, LIU Jie¹, MAO Qianqian¹, CAO Zhiyun^{1,2,3}, LIN Jiumao^{1,2,3*}

¹ Fujian Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

² Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou, Fujian 350122, China;

³ Key Laboratory of Integrative Medicine of Fujian Province University (Fujian University of Traditional Chinese Medicine), Fuzhou, Fujian 350122, China

*Correspondence: LIN Jiumao, E-mail: linjiumao@fjtcu.edu.cn

ABSTRACT Objective: To evaluate the inhibitory effect and mechanism of Pien Tze Huang (PZH) on long non-coding RNA-ANRIL (LncRNA-ANRIL) mediated lymphangiogenesis in colorectal cancer (CRC) *in vitro*. **Methods:** HCT-116 cells were cultured *in vitro*, and divided into control group and PZH group (treated with 0.25, 0.50, 0.75 mg/mL). CCK-8 assay was used to evaluate cell ability. The expression of LncRNA-ANRIL was detected by RT-qPCR, and the expression of VEGF-C was examined by Western blot. HCT-116 cells were transfected with Lipofectamine RNAiMAX and divided into Si-NC and Si-ANRIL groups. RT-qPCR was used to detect the expression of LncRNA-ANRIL. Phase-contrast microscope was used to observe the cell morphology. CCK-8 assay was used to detect cell viability. Western blot was used to detect the expression of VEGF-C protein. Treat HCT-116 cells with Si-NC, Si-ANRIL and Si-NC+PZH (0.25 mg/mL) respectively and collect cell culture supernatants (Tumor culture supernatants, TSNs) for the culture of human lymphatic endothelium cell (HLEC). CCK-8 assay was used to detect cell proliferation, cell migration and invasion were evaluated by Transwell assay. Tube Formation assay was used to observe lymphatic vessel formation ability. **Results:** Treatment of HCT-116 cells with different doses of PZH significantly inhibited the viability ($P < 0.01$). At the same time, PZH treatment in HCT-116 cells also reduced the expression of LncRNA-ANRIL ($P < 0.01$) and the expression of VEGF-C protein in a dose-dependent. Silencing LncRNA-ANRIL in HCT-116 cells, compared with Si-NC group, the expression of LncRNA-ANRIL in Si-ANRIL group was significantly reduced ($P < 0.05$), and the expression of cell density, cell viability ($P < 0.01$) and VEGF-C protein was also decreased. After the collected TSNs supernatant was used to treat HLEC cells, compared with the Si-NC group, Si-ANRIL and Si-NC+PZH (0.25 mg/mL) groups could remarkably decrease HLEC cell viability, migration and invasion ability and tube formation ability ($P < 0.01$). **Conclusion:** PZH can inhibit the expression of LncRNA-ANRIL in colorectal cancer cells and its mediated lymphangiogenesis in colorectal cancer. LncRNA-ANRIL is one of the targets of PZH in inhibiting lymphangiogenesis in colorectal cancer.

KEY WORDS colorectal cancer; Pien Tze Huang; human lymphatic endothelial cells; LncRNA-ANRIL; lymphangiogenesis

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.05008