



上海交通大学医学院
Shanghai Jiao Tong University School of Medicine

SHANGHAI JIAO TONG
UNIVERSITY
SCHOOL OF MEDICINE

学者介绍



张 靖 博士

ZHANG Jing M.D, Ph.D

副研究员、主治医师



ORCID ID: 0000-0002-9412-3567



张 靖 (1981—), 上海交通大学附属第六人民医院消化科科研秘书。2013 年获得上海交通大学医学院博士学位。2016 年至香港中文大学从事博士后工作。现任中国中西医结合消化专业委员会青年委员、全国胶囊内镜及肠病专家委员会青年委员、上海市中西医结合消化专业委员会委员兼秘书、上海市中西医结合消化专业委员会胶囊内镜及肠病组副组长。

长期从事消化系统疾病的临床、教学及科研工作, 专攻胃癌及肠病的中西医结合基础与临床研究, 尤其擅长国际前沿的小肠疾病诊治的磁控机器人胶囊技术。先后主持和主要参与国家自然科学基金项目 4 项。以第一作者和通信作者发表 SCI 收录论文 20 余篇 (其中 4 篇发表于 *Molecular Cancer*), 总影响因子超过 100, 单篇最高被引 200 余次。2015 年入选全国博士后管理委员会香江学者计划, 2019 年入选上海市教育委员会高峰高原学科建设计划。

ZHANG Jing (1981—), research secretary of the Department of Gastroenterology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University. In 2013, he received Ph.D from Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. In 2016, he went to The Chinese University of Hong Kong for postdoctoral work. At present, he serves as a young member of China Digestive Disease Committee of Integrated Chinese and Western Medicine, a young member of the National Committee of Capsule Endoscopy and Enteropathy Experts, a member and secretary of Shanghai Professional Committee of Digestive Diseases of Integrated Chinese and Western Medicine, and Deputy Group Leader of the Capsule Endoscopy and Enteropathy Group of Shanghai Professional Committee of Integrated Chinese and Western Medicine.

He has been engaged in the medical care, teaching and scientific research of digestive diseases for a long time, specializing in the basic and clinical research of the combination of traditional Chinese and Western medicine on gastric cancer and intestinal diseases, especially mastering the international cutting-edge magnetically-controlled robot capsule technology for the diagnosis and treatment of small intestinal diseases. He has presided over and participated in four NSFC projects and published more than 20 SCI-indexed papers as the first or corresponding author, including 4 papers published on *Molecular Cancer*. The impact factors of these papers are more than 100 scores, and the highest citation of a single paper is over 200 times. In 2015, he was selected into the Hong Kong Scholars Program of the National Postdoctoral Management Committee; in 2019, he was selected into Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support.



论著·基础研究

川楝素通过下调环状 RNA circDLST 对胃癌细胞 BGC-823 的抑制作用

张 靖

上海交通大学附属第六人民医院消化科, 上海 200233

[摘要] **目的**·探讨川楝素 (toosendanin, TSN) 通过调节环状 RNA circDLST 对胃癌细胞 BGC-823 生长和侵袭的影响。**方法**·利用不同浓度 TSN (0、0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理胃癌细胞系 BGC-823, 24 h 后定量 PCR 检测 TSN 对 circDLST 表达的影响。将 circDLST 过表达及其空载对照 (CON) 慢病毒载体转染胃癌细胞系 BGC-823, 然后以 0.5 $\mu\text{mol/L}$ TSN 或 PBS 处理, 即将细胞分为 circDLST+TSN 组、CON+TSN 组和 CON+PBS 组; MTT 增殖实验和 Transwell 侵袭实验观察细胞增殖和侵袭水平的变化。利用 circDLST 稳转细胞株 BGC-823 或对照细胞株建立裸鼠皮下移植瘤动物模型, 然后每日腹腔注射 200 $\mu\text{g/kg}$ TSN 或等量 PBS, 即将裸鼠分为 circDLST+TSN 组、CON+TSN 组和 CON+PBS 组, 观察皮下移植瘤的生长情况。**结果**·与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, 3 种浓度的 TSN 均可显著下调 circDLST 的表达水平 (均 $P<0.01$), 且呈浓度依赖性。TSN 可抑制胃癌细胞增殖和侵袭能力, 以及裸鼠皮下的移植瘤生长 (均 $P=0.000$), 而 circDLST 过表达可逆转 TSN 的这些作用 (均 $P<0.01$)。**结论**·TSN 可能通过下调 circDLST 抑制胃癌细胞 BGC-823 的生长和侵袭。

[关键词] 胃癌; 川楝素; 环状 RNA; circDLST; 肿瘤生长; 肿瘤侵袭

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.09.006 **[中图分类号]** R735.2 **[文献标志码]** A

Inhibitory effect of toosendanin on gastric cancer cells BGC-823 by downregulating circDLST

ZHANG Jing

Department of Gastroenterology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China.

[Abstract] **Objective**·To investigate the effect of toosendanin (TSN) on the growth and invasion of gastric cancer cells BGC-823 by regulating circDLST expression. **Methods**·After gastric cancer cells BGC-823 were exposed to different concentrations of TSN (0, 0.5, 1.0, and 2.0 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, quantitative PCR was used to detect the expression of circDLST. BGC-823 cells were transfected with the circDLST overexpression lentiviral vector or its control vector (CON), and then treated with 0.5 $\mu\text{mol/L}$ TSN or PBS. So the cells were divided into circDLST+TSN group, CON+TSN group and CON+PBS group. The viability and invasive potential of BGC-823 cells were observed by MTT proliferation test and Transwell invasion assay. The subcutaneous transplanted tumor models were established by using circDLST-transfected cell line BGC-823 or the control cell line in nude mice, and then 200 $\mu\text{g/kg}$ TSN or the same volume of PBS was injected intraperitoneally every day. So the mice were divided into circDLST+TSN group, CON+TSN group and CON+PBS group. **Results**·Compared with the control group (0 $\mu\text{mol/L}$), all 3 concentrations of TSN decreased the expression levels of circDLST in a concentration dependent manner ($P<0.01$). TSN could significantly reduce the cell viability, cell invasion and subcutaneous xenograft tumor growth ($P=0.000$), while circDLST overexpression reversed the inhibitory effect of TSN ($P<0.01$). **Conclusion**·TSN may inhibit the growth and invasion of gastric cancer cells BGC-823 by downregulating circDLST expression.

[Key words] gastric cancer; toosendanin; circular RNA; circDLST; tumor growth; tumor invasion

胃癌是常见的恶性肿瘤之一, 尽管全球胃癌的发生率和死亡率呈下降趋势^[1], 但在我国胃癌仍位居恶性肿瘤死因的第3位^[2]。传统中医药在抗肿瘤转移和复发、改善患者生活质量等方面也具有一定的作用。川楝素

(toosendanin, TSN) 是川楝树根皮及川楝子的有效提取物, 具有多种生物学效应, 包括抗肿瘤作用, 抑制多种肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡^[3-5]。我们前期研究^[3-4]发现, TSN 可以通过阻断蛋白激酶 B (protein kinase B,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81873143); 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划 (20191831)。

[作者简介] 张 靖 (1981—), 男, 副研究员, 主治医师, 博士; 电子信箱: jing5522724@163.com。

[通信作者] 同上。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81873143); Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support (20191831)。

[Corresponding Author] ZHANG Jing, E-mail: jing5522724@163.com.

PKB 或 AKT) / 糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β) 信号通路抑制胃肠肿瘤细胞增殖, 诱导其凋亡, 增强肿瘤细胞化学治疗 (化疗) 敏感性。

环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一种共价闭合环状结构的非编码 RNA, 广泛存在于各种生物细胞中, 它是由前体线性 RNA 反向剪接产生, 具有结构稳定、序列保守和组织特异性等特征^[6]。circRNA 与胃癌密切相关: circ_0047905、circ_0138960 和 circ_7690-15 在胃癌组织中高表达, 促进胃癌细胞的增殖和侵袭能力^[7]; circ_100269 通过靶向 miR-630 抑制胃癌增殖^[8]; circDONSON 通过核小体重构因子 (nucleosome remodeling factor, NURF) 复合物依赖的 SOX4 (SRY-related HMG box transcription factor 4) 激活促进胃癌生长和侵袭^[9]; circLARP4 通过吸附 miR-424-5p 激活大肿瘤抑制激酶 1 (large tumor suppressor kinase 1, LATS1) 抑制胃癌侵袭作用^[10]; circDLST 通过吸附 miR-502-5p 和激活 NRAS (NRAS proto-oncogene, GTPase) / MEK1 (mitogen-activated protein kinase kinase 1) / ERK1/2 (mitogen-activated protein kinase 1/2) 信号促进胃癌生长和侵袭^[11]。我们利用 TSN 处理组和对照组筛选差异表达的 circRNA, 发现 TSN 明显调控 circDLST。本研究旨在通过观察 TSN 对 circDLST 表达及胃癌生长的影响, 为胃癌治疗提供潜在的策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂和仪器 TSN (纯度 $\geq 99\%$) 购自上海源业生物科技有限公司, 噻唑蓝 (MTT) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司 (南京), TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, circDLST 过表达及其空载对照慢病毒载体购自上海吉凯生物科技有限公司, 反转录试剂盒和 SYBR Green Master Mixture 购自日本 TaKaRa 公司, Transwell 试剂盒购自美国 BD 公司。实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Kray Technologies 公司, 酶标分析仪 (型号 BS-1101) 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.1.2 胃癌细胞系 人胃癌细胞系 BGC-823 购自中国科学院细胞库。

1.1.3 实验动物 雄性 BALB/c 裸鼠 (4 ~ 5 周龄, 18 ~ 20 g) 购自中国科学院上海生命科学研究院上海斯莱克实验动物责任有限公司, 实验动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2017-0005。裸鼠饲养于上海市第六人民医院动物实验室, SPF 级饲养, 带有密封空气过滤装置的塑料

笼, 实验动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2016-0020。

1.2 实验方法

1.2.1 定量 PCR 用不同浓度 TSN (0、0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理胃癌细胞 BGC-823 24 h 后, TRIzol 提取总 RNA, 并通过 M-MLV 反转录酶合成 cDNA, 使用 SYBR Green Master Mixture 试剂盒进行 cDNA 扩增。circDLST 上、下游引物序列分别为 5'-TACAGTCAAAACCCAGCGT-3' 和 5'-GTTGTTAATGCTTTCTCCAC-3'。以 β -肌动蛋白 (β -actin) 为内参对照, 上、下游引物序列分别为 5'-GTGGCCGAGGACTTTGATTG-3' 和 5'-CCTGTAACAACGCATCTCATATT-3'。每个样品重复 3 次。

1.2.2 MTT 增殖实验 将 circDLST 过表达及其空载对照 (CON) 慢病毒载体转染胃癌细胞 BGC-823, 具体转染方法参考文献 [11]。细胞在 96 孔培养板中培养, 密度为 5×10^3 孔。细胞贴壁 48 h 后, 以 0.5 $\mu\text{mol/L}$ TSN 处理细胞。每隔 24 h 分析细胞增殖活性, 加入 20 μL MTT (5 mg/mL) 孵育 4 h 后, 加入 150 μL 二甲亚砜溶解 5 min, 使用酶标分析仪在 570 nm 处检测吸光度值。实验分为 circDLST+TSN 组、CON+TSN 组和 CON+PBS 组, 重复 3 次。

1.2.3 Transwell 侵袭实验 将 circDLST 过表达及其空载对照慢病毒载体转染胃癌细胞 BGC-823, 细胞贴壁 48 h 后, 以 0.5 $\mu\text{mol/L}$ TSN 处理细胞 24 h。使细胞悬浮在无血清培养基中饥饿 24 h 后, 将悬浮细胞添加到含有基质凝胶 (3.9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 的上层小室; 而下层小室含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。最后穿过凝胶的细胞用 75% 乙醇固定, 并用结晶紫进行染色。光学显微镜下对每组挑选 3 个视野进行细胞计数, 实验分为 circDLST+TSN 组、CON+TSN 组和 CON+PBS 组, 重复 3 次。

1.2.4 裸鼠皮下移植瘤模型建立 将 circDLST 过表达及其空载对照慢病毒载体转染胃癌细胞 BGC-823 后, 皮下注射接种 (1×10^7 只), 建立裸鼠皮下移植瘤动物模型。12 d 后, 将模型裸鼠随机分为 3 组: circDLST+TSN 组 ($n=6$), circDLST 转染的胃癌细胞 BGC-823 建立裸鼠皮下移植瘤后, 每日腹腔注射 200 $\mu\text{g/kg}$ TSN^[3]; CON+TSN 组 ($n=6$), CON 转染的胃癌细胞 BGC-823 建立裸鼠皮下移植瘤后, 每日腹腔注射 200 $\mu\text{g/kg}$ TSN; CON+PBS 组 ($n=6$), CON 转染的胃癌细胞 BGC-823 建立裸鼠皮下移植瘤后, 每日腹腔注射等量的 PBS。每隔 1 日用游标卡尺测量裸鼠皮下肿瘤的长径 (a) 和短径 (b), 计算肿瘤体积 $V=1/2ab^2$ 。注射 32 d 后处死各组裸鼠。动物研究获得上海交通大学附属第六人民医院动物实验室的伦理许可。

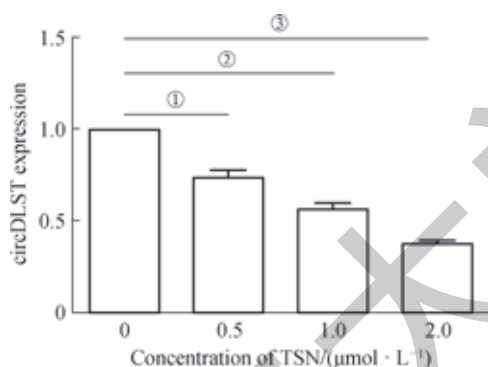
1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组数据之间的比较采用独立样本 t 检验, 2 组以上数据之间的比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TSN 对胃癌细胞中 circDLST 表达的影响

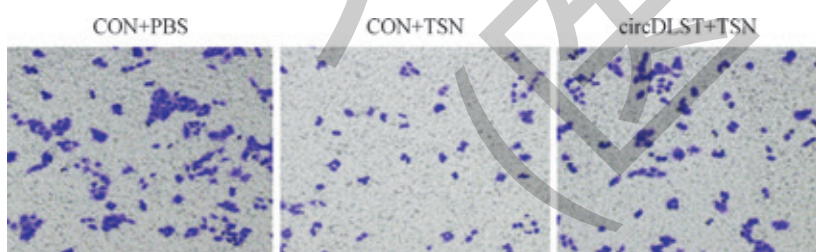
利用不同浓度 TSN (0、0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理胃癌细胞 24 h 后, 定量 PCR 结果 (图 1) 显示, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, TSN 明显下调 circDLST 的表达水平, 且呈浓度依赖性 (均 $P < 0.01$)。



Note: ^① $P=0.003$, ^② $P=0.009$, ^③ $P=0.000$.

图 1 不同浓度 TSN 对胃癌细胞中 circDLST 表达的抑制作用

Fig 1 Inhibitory effects of different concentrations of TSN on circDLST expression in gastric cancer cells



Note: ^① $P=0.000$.

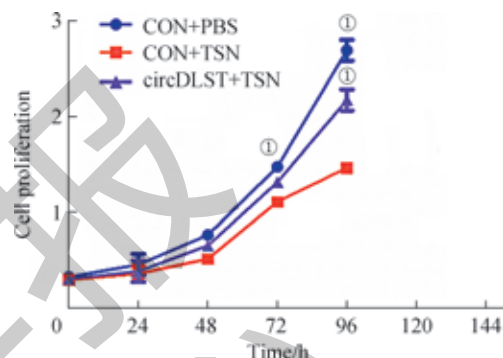
图 3 circDLST 对 TSN 抗胃癌细胞侵袭能力的逆转效果

Fig 3 Reverse effect of circDLST on the anti-invasion potential of TSN in gastric cancer cells

2.2 TSN 通过调节 circDLST 对胃癌细胞增殖活性的影响

2.2 TSN 通过调节 circDLST 对胃癌细胞增殖活性的影响

之前的研究^[11]已报道 circDLST 过表达载体在 BGC-823 胃癌细胞具有高的转染效率。circDLST 过表达载体或空载体转染胃癌细胞后, 以 0.5 $\mu\text{mol/L}$ TSN 处理。MTT 增殖实验结果 (图 2) 显示, 与 CON+PBS 组比较, TSN 作用 72 h 后可显著抑制胃癌细胞增殖活性 (均 $P=0.000$); 而与 CON+TSN 组比较, 过表达 circDLST 可逆转 TSN 抗胃癌细胞增殖活性的作用 ($P=0.000$)。



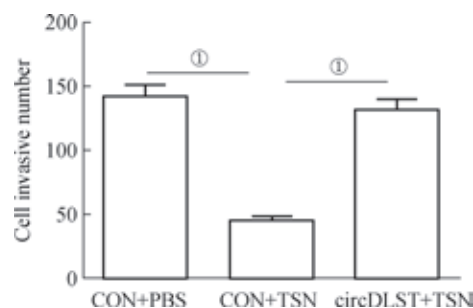
Note: ^① $P=0.000$, vs CON+TSN group.

图 2 circDLST 对 TSN 抗胃癌细胞增殖活性的逆转效果

Fig 2 Reverse effect of circDLST on the anti-proliferation activity of TSN in gastric cancer cells

2.3 TSN 通过调节 circDLST 对胃癌细胞侵袭能力的影响

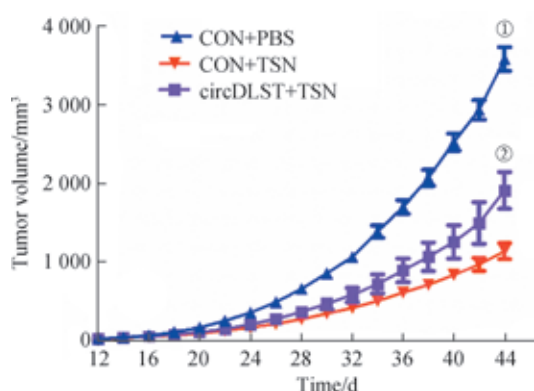
Transwell 侵袭实验 (图 3) 显示, 与 CON+PBS 组比较, TSN 可显著抑制胃癌细胞的侵袭能力 ($P=0.000$); 而与 CON+TSN 组比较, 过表达 circDLST 可逆转 TSN 抗胃癌细胞侵袭能力的作用 ($P=0.000$)。



2.4 TSN 通过调节 circDLST 对胃癌皮下移植瘤生长的影响

circDLST 过表达载体或空载体转染 BGC-823 细胞后皮下注射裸鼠, 然后每日腹腔注射 TSN 或 PBS。结果 (图 4) 显示, 注射 32 d 后, 与 CON+PBS 组比较, TSN

可显著抑制胃癌细胞皮下移植瘤的生长 ($P=0.000$); 而与 CON+TSN 组比较, 过表达 circDLST 可逆转 TSN 抗胃癌皮下移植瘤生长的作用 ($P=0.020$)。



Note: ^① $P=0.000$, ^② $P=0.020$.

图4 circDLST对TSN抗胃癌皮下移植瘤生长的逆转效果

Fig 4 Reverse effect of circDLST on the anti-xenograft tumor growth of TSN in gastric cancer cells

3 讨论

肿瘤侵袭转移是导致胃癌患者不良预后的主要原因之一。最近研究^[12]显示, circRNA异常表达与胃癌生存、转移及不良预后密切相关。circRNA主要包括外显子 circRNA、外显子内含子 circRNA (exon-intron circRNA,

EIciRNA) 和内含子 circRNA, 其中外显子 circRNA 占绝大多数。circRNA 的环状结构赋予了它们独特的生物学特性, 如稳定性较强。circRNA 还能与 miRNA 及蛋白质竞争性结合, 参与蛋白质编码和转录调节^[13]。研究^[10-13]发现, circ-102958、circ-0000520、circ-0001017 可能对早期胃癌具有潜在的诊断价值; circLARP4、circPSMC3、circDLST 的异常表达与胃癌的发生发展密切相关。我们前期研究^[11]亦发现, circDLST 作为外显子 circRNA 主要定位在胃癌细胞的细胞质, 其异常上调可促进胃癌细胞的侵袭转移, 并与患者的不良预后相关, 提示其可能成为判断胃癌患者预后的潜在标志物。

本研究发现, 不同浓度 TSN 对胃癌细胞中 circDLST 表达具有抑制作用; 同时 TSN 可抑制胃癌细胞增殖活性、侵袭潜能和皮下移植瘤生长, 而过表达 circDLST 对 TSN 的抗肿瘤效果具有逆转作用。因此, 提示 TSN 可能通过下调 circDLST 抑制胃癌细胞增殖和侵袭; 但是 TSN 对 circDLST 下游的 miRNA 及信号通路的调节作用仍有待进一步的探究, 以期为其抗胃癌作用提供更多的实验依据。

参·考·文·献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2013[J]. Cancer Lett, 2017, 401: 63-71.
- [3] Wang G, Feng CC, Chu SJ, et al. Toosendanin inhibits growth and induces apoptosis in colorectal cancer cells through suppression of AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway[J]. Int J Oncol, 2015, 47(5): 1767-1774.
- [4] Wang G, Huang YX, Zhang R, et al. Toosendanin suppresses oncogenic phenotypes of human gastric carcinoma SGC-7901 cells partly via miR-200a-mediated downregulation of β -catenin pathway[J]. Int J Oncol, 2017, 51(5): 1563-1573.
- [5] Ju JM, Qi ZC, Cai XT, et al. Toosendanin induces apoptosis through suppression of JNK signaling pathway in HL-60 cells[J]. Toxicol In Vitro, 2013, 27(1): 232-238.
- [6] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA, 2013, 19(2): 141-157.
- [7] Lai ZY, Yang Y, Yan YC, et al. Analysis of co-expression networks for circular RNAs and mRNAs reveals that circular RNAs hsa_circ_0047905, hsa_circ_0138960 and has-circRNA7690-15 are candidate oncogenes in gastric cancer[J]. Cell Cycle, 2017, 16(23): 2301-2311.
- [8] Zhang Y, Liu H, Li WD, et al. CircRNA_100269 is downregulated in gastric cancer and suppresses tumor cell growth by targeting miR-630[J]. Aging (Albany NY), 2017, 9(6): 1585-1594.
- [9] Ding LX, Zhao YY, Dang SW, et al. Circular RNA circ-DONSON facilitates gastric cancer growth and invasion via NURF complex dependent activation of transcription factor SOX4[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 45.
- [10] Zhang J, Liu H, Hou LD, et al. Circular RNA_LARP4 inhibits cell proliferation and invasion of gastric cancer by sponging miR-424-5p and regulating LATS1 expression[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 151.
- [11] Zhang J, Hou LD, Liang R, et al. CircDLST promotes the tumorigenesis and metastasis of gastric cancer by sponging miR-502-5p and activating the NRAS/MEK1/ERK1/2 signaling[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 80.
- [12] Wang S, Tang D, Wang W, et al. CircLMTK2 acts as a sponge of miR-150-5p and promotes proliferation and metastasis in gastric cancer[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 162.
- [13] Ruan Y, Li Z, Shen YJ, et al. Functions of circular RNAs and their potential applications in gastric cancer[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 14(2): 85-92.

[收稿日期] 2020-03-10

[本文编辑] 瞿麟平