

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.10.001

❖ 基础研究 ❖

槐耳多糖抑制 AEG-1 表达对子宫内膜癌细胞生物学行为的影响

张泽敏¹, 庞岚²

(1. 邯郸市第一医院产科; 2. 邯郸市妇幼保健院妇科, 河北 邯郸 056000)

【摘要】目的: 探究槐耳多糖(HP)对子宫内膜癌细胞生物学行为和星形胶质细胞升高基因 1(AEG-1)表达的影响。**方法:** 采用不同浓度 HP(0~11 μg/mL)处理人子宫内膜癌 ishikawa 细胞 24 h,通过检测细胞活力确定 HP 处理浓度;将 ishikawa 细胞分为 Ct 组(正常培养)、HP-L 组(1 μg/mL HP)、HP-H 组(5 μg/mL HP)、si-NC 组(转染 si-NC)、si-AEG-1 组(转染 si-AEG-1)、HP-H + pcDNA 组(转染 pcDNA + 5 μg/mL HP)、HP-H + pcDNA-AEG-1 组(转染 pcDNA-AEG-1 + 5 μg/mL HP)。CCK-8 法、EdU 染色测定细胞增殖活性;流式细胞术、Transwell、划痕实验分别检测细胞凋亡、侵袭、迁移;Western blot 评估 AEG-1、细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)蛋白表达水平。通过细胞实验分组进行裸鼠体内成瘤试验检测 HP 及 AEG-1 对裸鼠肿瘤生长的影响。**结果:** 选取 1 μg/mL HP、5 μg/mL HP 分别作为后续处理 ishikawa 细胞的低、高剂量浓度;与 Ct 组比较,HP-L 组、HP-H 组细胞 OD450 值、EdU 阳性率、划痕愈合率、侵袭细胞数、AEG-1、CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平、裸鼠肿瘤质量均降低($P < 0.05$),细胞凋亡率、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平均升高($P < 0.05$);与 Ct 组、si-NC 组比较,si-AEG-1 组细胞 OD450 值、EdU 阳性率、划痕愈合率、侵袭细胞数、AEG-1、CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平、裸鼠肿瘤质量均降低,细胞凋亡率、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平均升高($P < 0.05$);与 HP-H 组、HP-H + pcDNA 组比较,HP-H + pcDNA-AEG-1 组细胞 OD450 值、EdU 阳性率、划痕愈合率、侵袭细胞数、AEG-1、CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平、裸鼠肿瘤质量均升高,细胞凋亡率、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平均降低($P < 0.05$)。**结论:** 槐耳多糖可能通过下调 AEG-1 调控 ishikawa 细胞生物学行为。

【关键词】 槐耳多糖;星形胶质细胞升高基因 1;细胞增殖;细胞迁移

【中图分类号】 R737.33 **【文献标志码】** A

Impact of Huaier polysaccharide on biological behaviors of endometrial cancer cells by inhibiting AEG-1 expression

ZHANG Ze-min¹, PANG Lan²

(1. Department of Obstetrics, the First Hospital of Handan; 2. Department of Gynecology, Handan Maternal and Child Health Hospital, Handan 056000, Hebei, China)

【Abstract】Objective: To investigate the impact of Huaier polysaccharide (HP) on the biological behaviors of endometrial cancer cells and the expression of astrocyte elevated gene-1 (AEG-1). **Methods:** Different concentrations of HP (0~11 μg/mL) treated human endometrial cancer ishikawa cells for 24 hours, and determined the HP treatment concentration by detecting the cell viability. Ishikawa cells were divided into the Ct group (normally culture), HP-L group (1 μg/mL HP), HP-H group (5 μg/mL HP), si-NC group (transfected with si-NC), si-AEG-1 group (transfected with si-AEG-1), HP-H + pcDNA group (transfected with pcDNA + 5 μg/mL HP), and HP-H + pcDNA-AEG-1 group (transfected with pcDNA-AEG-1 + 5 μg/mL HP). Cell proliferation was measured by CCK-8 method and EdU staining. Flow cytometry, Transwell and scratch assay were used to detect cell apoptosis, invasion and migration, respectively. The protein expression of AEG-1, Cyclin D1, matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, Bcl-2-associated X protein (Bax), and Caspase-3 were detected by Western blot. The effect of HP and AEG-1 on tumor growth in nude mice was detected through cell experiment grouping and in vivo tumor formation test. **Results:** Select 1 μg/mL HP, 5 μg/mL HP as low and high dose concentration of ishikawa cells for subsequent treatment. Compared with the Ct group, the OD450 value of ishikawa cells, EdU positive rate, scratch healing rate, number of invasive cells, the protein expression of AEG-1, CyclinD1, MMP-2, MMP-9, and the tumor mass in nude mice decreased in the HP-L group and HP-H group ($P < 0.05$), and the apoptosis rate, and the expression of Bax and Caspase-3 pro-

基金项目: 河北省医学科学研究课题计划项目(20200441)

作者简介: 张泽敏(1987-),女,主治医师。E-mail: ndgi43@163.com

通讯作者: 庞岚。E-mail: zhui2437669@163.com

tein increased ($P < 0.05$). Compared with Ct group and si-NC group, the OD450 value of ishikawa cells, EdU positive rate, scratch healing rate, number of invasive cells, the protein expression of AEG-1, CyclinD1, MMP-2, MMP-9, and the tumor mass in nude mice decreased in the si-AEG-1 group, and the apoptosis rate, and the expression of Bax and Caspase-3 protein increased ($P < 0.05$). Compared with HP-H group and HP-H + pcDNA group, the OD450 value of ishikawa cells, EdU positive rate, scratch healing rate, number of invasive cells, the protein expression of AEG-1, CyclinD1, MMP-2, MMP-9, and the tumor mass in nude mice increased in the HP-H + pcDNA-AEG-1 group, and the apoptosis rate, and the expression of Bax and Caspase-3 protein decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Huaier polysaccharide regulates the biological behavior of ishikawa cells by down-regulating AEG-1.

【Key words】 Huaier polysaccharide; Astrocyte elevated gene 1; Cell proliferation; Cell migration

子宫内膜癌 (endometrial cancer, EC) 是全球女性中第4常见的妇科肿瘤^[1], 发病率呈逐渐上升趋势, 且趋于年轻化^[2]。手术、激素治疗、放化疗和新型靶向治疗等是目前治疗 EC 的主要方法, 但 EC 患者的5年生存率并没有显著提高^[3]。因此, 全面了解 EC 发病机制, 寻找更有效的 EC 治疗方法势在必行。槐耳多糖 (Huaier polysaccharide, HP) 是从 *Trametes robiniophila* Murr 中提取的一种活性成分, 其可抑制乳腺癌恶性进展^[4]; 且 HP 可促进胃癌细胞凋亡并抑制增殖^[5]。而关于 HP 对 EC 细胞生物学行为的影响尚不清楚。星形胶质细胞升高基因 1 (Astrocyte elevated gene-1, AEG-1) 是一种致癌基因, 其在 EC 组织中表达量异常升高, 且与癌细胞的侵袭、转移密切相关^[6]; 相关报道^[7]称 HP 通过失活 AEG-1 通路抑制肝癌细胞转移。而目前 HP 能否通过抑制 AEG-1 影响 EC 细胞生物学行为尚不明确。因此, 本研究拟观察 HP 对 EC 细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡的影响及其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及动物

人子宫内膜癌 ishikawa 细胞购自上海慧颖生物公司。35 只 4~6 周龄、体重为 15~22 g 的雌性 BALB/c 裸鼠购自导科医药技术 (广东) 有限公司 (SCXK (粤) 2022-0060)。温度 (22 ± 2 °C)、湿度约 60%、光照 (12 h 光照, 12 h 黑暗), 将 BALB/c 裸鼠饲养在独立的标准清洁笼中, 在整个实验过程中可随意饮食和饮水。

1.2 主要试剂

槐耳多糖粗提物购自启东盖天力药业有限公司, 将槐耳多糖粗提物用二乙氨基乙基纤维素-52 层析柱析出, 再用蒸馏水洗涤, 0.1~0.3 mol/L 氯化钠洗脱。HP 的纯度通过以葡萄糖为标准的苯酚-硫酸法进行评估, HP 用 PBS 稀释以制备 50 mg/mL 的储备溶液并储存在 -20 °C; AEG-1 小干扰 RNA (si-AEG-1) 及其阴性对照 (si-NC)、AEG-1 过表达物 (pcDNA-AEG-1) 及其阴性对照 (pcDNA) 均购自广州基迪奥生物公司; CCK-8 试剂盒购自上海科艾博

生物公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒购自杭州联科美讯生物公司; 兔源一抗 AEG-1、细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-Associated X Protein, Bax)、半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP)-2、MMP-9、GAPDH 及羊抗兔 IgG 二抗均购自英国 Abcam 公司。

1.3 HP 作用浓度的确定

将 ishikawa 细胞悬液均匀铺入 96 孔板中, 待细胞生长至 80% 汇合度时, 分别加入 0、1、3、5、7、9、11 $\mu\text{g/mL}$ HP 处理 ishikawa 细胞 24 h, 继续加入 10 μL CCK-8 试剂在 37 °C 下孵育 2 h, 酶标仪测量细胞在 450 nm 下 OD 值。细胞活力 = $(\text{OD}_{\text{实验孔}} - \text{OD}_{\text{空白孔}}) / (\text{OD}_{\text{对照孔}} - \text{OD}_{\text{空白孔}})$ 。

1.4 细胞培养与分组

将 ishikawa 细胞在 37 °C、5% CO_2 条件下, 于 DMEM 培养基 (10% 胎牛血清) 中培养。取对数生长期的 ishikawa 细胞, 分为 Ct 组 (正常培养的 ishikawa 细胞)、HP-L 组^[8] (1 $\mu\text{g/mL}$ HP 处理细胞 48 h)、HP-H 组^[8] (5 $\mu\text{g/mL}$ HP 处理细胞 48 h)、si-NC 组 (细胞转染 si-NC 48 h)、si-AEG-1 组 (细胞转染 si-AEG-1 48 h), 根据前期预实验结果, 5 $\mu\text{g/mL}$ HP 对 ishikawa 细胞生物学行为的影响显著优于 1 $\mu\text{g/mL}$ HP, 故后续选择 5 $\mu\text{g/mL}$ HP 与 pcDNA-AEG-1 共同处理 ishikawa 细胞以探究 HP 与 AEG-1 对 ishikawa 细胞生物学行为的影响, 故在上述分组的基础上再进行以下分组: HP-H + pcDNA 组 (细胞转染 pcDNA 48h 后再用 5 $\mu\text{g/mL}$ HP 处理 48 h)、HP-H + pcDNA-AEG-1 组 (细胞转染 pcDNA-AEG-1 48 h 后再用 5 $\mu\text{g/mL}$ HP 处理 48 h)。收集各组细胞用于后续实验。

1.5 CCK-8 法检测 ishikawa 细胞增殖

将各组 ishikawa 细胞以 5×10^4 个/孔的密度 96 孔板中, 孵育 48 h 后, 各加入 CCK-8 试剂 10 μL , 再 37 °C 下孵育 2 h。利用酶标仪上测量各组细胞在 450 nm 下的光密度 (OD) 值。

1.6 EdU 染色检测 ishikawa 细胞增殖

ishikawa 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培

培养基重悬,与 10 μM EdU 一起培养 2 h,再按照 1.3 中的方法处理细胞。胰蛋白酶消化后,经离心、洗涤、固定、透化和 1 \times Apollo 反应混合物孵育后,用 DAPI 对 DNA 进行染色。通过流式细胞仪检测细胞增殖,并通过 EdU 阳性细胞的百分比估计增殖能力。

1.7 流式细胞术检测 ishikawa 细胞凋亡

各组 ishikawa 细胞采用 PBS 缓冲液洗涤后,于结合缓冲液重悬,加入 Annexin V-FITC 和碘化丙啶各 5 μL ,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 30 min,接着在 500 μL 结合缓冲液中重悬,最后通过流式细胞仪分析细胞凋亡情况,细胞凋亡率 = (凋亡细胞数目/总细胞数目) \times 100%。

1.8 划痕愈合实验检测 ishikawa 细胞迁移

ishikawa 细胞按 1.3 的方法处理后接种在 6 孔板中,达到 100% 汇合度后,用 200 μL 移液枪枪头在各孔底部制造划痕。然后将细胞与无血清培养基一起孵育 48 h。利用光学显微镜观察迁移情况,划痕愈合率(%) = (0 h 划痕宽度 - 48 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度 \times 100%。

1.9 Transwell 测定 ishikawa 细胞侵袭

用无血清培养基稀释的基质胶平铺在 Transwell 上室,上室在室温下风干备用。将无血清培养基稀释的细胞悬液(2×10^5 个/200 μL)添加到 Transwell 上室。将含有 10% 胎牛血清的培养基 600 μL 加入到下室。将小室在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 48 h 后,取出小室后,用磷酸盐缓冲溶液洗涤两次。用棉签去除残留细胞,95% 酒精固定后进行结晶紫染色。用光学显微镜观察细胞侵袭情况。

1.10 Western blot 检测 ishikawa 细胞中相关蛋白表达水平

RIPA 裂解缓冲液用于裂解 ishikawa 细胞。将细胞裂解物在冰上孵育 15min 后,以 12 000 r/min 的转速离心 20 min。蛋白质浓度采用二辛可宁酸试剂盒测定。取 30 μg 蛋白质样品进行 SDS-PAGE,转至聚偏二氟乙烯膜。用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭膜 1 h,然后与一抗 AEG-1 (1 : 1 000)、CyclinD1 (1 : 2 000)、Bax (1 : 1 000)、Caspase-3 (1 : 1 000)、MMP-2 (1 : 2 000)、MMP-9 (1 : 1 000)、GAPDH (1 : 2 000) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。将膜彻底清洗后,将其与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗兔抗体在室温下孵育 1 h。用 ECL 试剂观察蛋白质印迹,Image J 软件分析蛋白表达。

1.11 裸鼠体内肿瘤生长实验

将 ishikawa 细胞悬液以 1×10^7 个/200 μL 通过皮下注射到裸鼠左侧腋窝,当肿瘤直径约为 10 mm 时,将小鼠随机分为 7 组:裸鼠 Ct 组(灌胃生理盐水

且还需皮下注射生理盐水)、裸鼠 HP-L 组^[8](灌胃 25 $\mu\text{g/g}$ HP 且还需皮下注射生理盐水)、裸鼠 HP-H 组^[8](灌胃 100 $\mu\text{g/g}$ HP 且还需皮下注射生理盐水)、裸鼠 si-NC 组(皮下注射转染 si-NC 的 ishikawa 细胞且还需灌胃生理盐水)、裸鼠 si-AEG-1 组(皮下注射转染 si-AEG-1 的 ishikawa 细胞且还需灌胃生理盐水)、裸鼠 HP-H + pcDNA 组(皮下注射转染 pcDNA 的 ishikawa 细胞且灌胃 100 $\mu\text{g/g}$ HP)、裸鼠 HP-H + pcDNA-AEG-1 组(皮下注射转染 pcDNA-AEG-1 的 ishikawa 细胞且灌胃 100 $\mu\text{g/g}$ HP),每组各 5 只。给药 1 次/d,连续 28 d 后,用 2% 戊巴比妥钠处死小鼠,取出移植的肿瘤,称量肿瘤质量。

1.12 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间差异比较行单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 HP 对 ishikawa 细胞活力的影响

与浓度 0 $\mu\text{g/mL}$ HP 比较,1 $\mu\text{g/mL}$ HP、3 $\mu\text{g/mL}$ HP、5 $\mu\text{g/mL}$ HP 处理的 ishikawa 细胞活力升高,7 $\mu\text{g/mL}$ HP、9 $\mu\text{g/mL}$ HP、11 $\mu\text{g/mL}$ HP 处理的 ishikawa 细胞活力降低,因此选取 1 $\mu\text{g/mL}$ HP、5 $\mu\text{g/mL}$ HP 分别作为后续处理 ishikawa 细胞的低、高剂量浓度。见表 1。

表 1 不同浓度 HP 对 ishikawa 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$)

| HP 浓度($\mu\text{g/mL}$) | 细胞活力 |
|---------------------------|------------------|
| 0 | 1.00 \pm 0.02 |
| 1 | 1.15 \pm 0.03* |
| 3 | 1.33 \pm 0.04* |
| 5 | 1.57 \pm 0.06* |
| 7 | 0.91 \pm 0.04* |
| 9 | 0.82 \pm 0.06* |
| 11 | 0.83 \pm 0.05* |

* $P < 0.05$,与浓度 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较。

2.2 HP 对 ishikawa 细胞增殖能力的影响

与 Ct 组比较,HP-L 组、HP-H 组 ishikawa 细胞 OD450 值、EdU 阳性率均降低($P < 0.05$);与 Ct 组、si-NC 组比较,si-AEG-1 组 ishikawa 细胞 OD450 值、EdU 阳性率均降低($P < 0.05$);与 HP-H 组、HP-H + pcDNA 组比较,HP-H + pcDNA-AEG-1 组 ishikawa 细胞 OD450 值、EdU 阳性率均升高($P < 0.05$)。见图 1 及表 2。

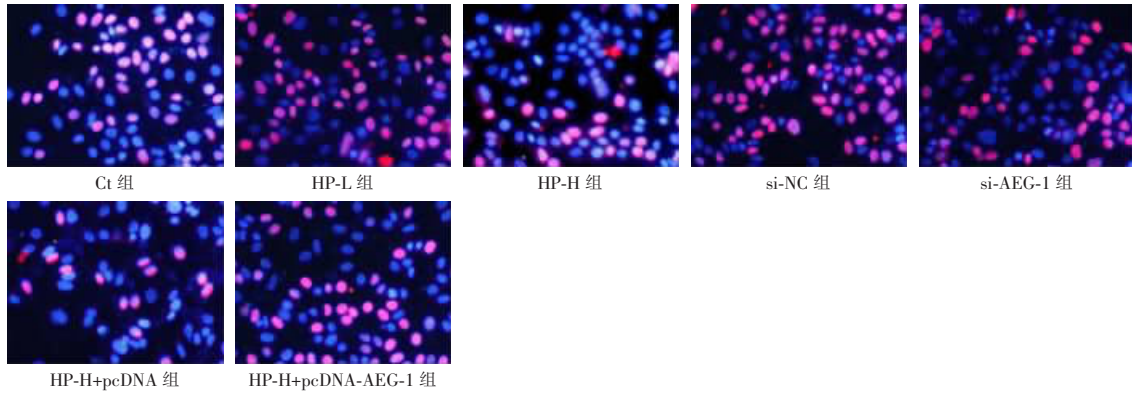


图 1 EdU 染色检测 ishikawa 细胞增殖(400×)
EdU 阳性细胞呈红色荧光;DAPI 染色细胞呈蓝色荧光。

表 2 各组 ishikawa 细胞 OD450 值及 EdU 阳性率比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | OD450 值 | EdU 阳性率 (%) |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Ct 组 | 1.28 ± 0.12 | 70.24 ± 3.58 |
| HP-L 组 | 0.97 ± 0.10 [*] | 60.22 ± 3.26 [*] |
| HP-H 组 | 0.54 ± 0.04 ^{*#} | 28.89 ± 1.74 ^{*#} |
| si-NC 组 | 1.30 ± 0.13 | 68.86 ± 3.43 |
| si-AEG-1 组 | 0.52 ± 0.04 ^{*▲} | 31.17 ± 2.04 ^{*▲} |
| HP-H + pcDNA 组 | 0.53 ± 0.05 | 27.73 ± 1.63 |
| HP-H + pcDNA-AEG-1 组 | 0.81 ± 0.07 ^{△&} | 51.02 ± 2.23 ^{△&} |

* $P < 0.05$, 与 Ct 组比较; # $P < 0.05$, 与 HP-L 组比较; △ $P < 0.05$, 与 HP-H 组比较; ▲ $P < 0.05$, 与 si-NC 组比较; & $P < 0.05$, 与 HP-H + pcDNA 组比较。

2.3 HP 对 ishikawa 细胞凋亡能力的影响

与 Ct 组比较, HP-L 组、HP-H 组 ishikawa 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$); 与 Ct 组、si-NC 组比较, si-AEG-1 组 ishikawa 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$); 与 HP-H 组、HP-H + pcDNA 组比较, HP-H + pcDNA-AEG-1 组 ishikawa 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。见图 2 及表 3。

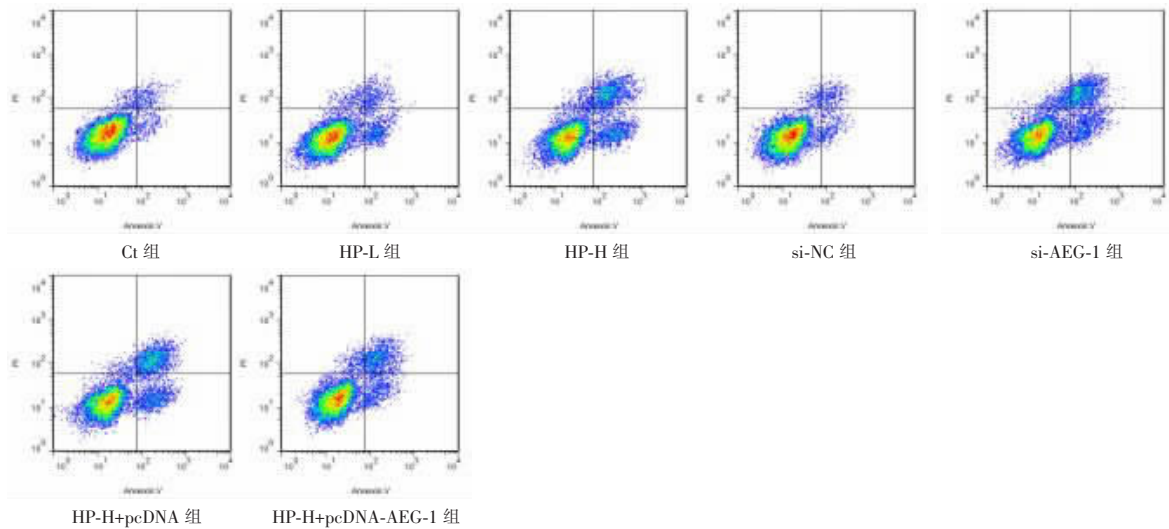


图 2 流式细胞术检测 ishikawa 细胞凋亡

表 3 各组 ishikawa 细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 细胞凋亡率 (%) |
|----------------------|--------------------------------|
| Ct 组 | 10.31 ± 1.13 |
| HP-L 组 | 18.89 ± 1.41 [*] |
| HP-H 组 | 39.32 ± 2.57 ^{*#} |
| si-NC 组 | 11.12 ± 1.08 |
| si-AEG-1 组 | 36.84 ± 2.78 ^{*▲} |
| HP-H + pcDNA 组 | 38.84 ± 2.66 |
| HP-H + pcDNA-AEG-1 组 | 25.57 ± 2.34 ^{△&} |

* $P < 0.05$, 与 Ct 组比较; # $P < 0.05$, 与 HP-L 组比较; △ $P < 0.05$, 与 HP-H 组比较; ▲ $P < 0.05$, 与 si-NC 组比较; & $P < 0.05$, 与 HP-H + pcDNA 组比较。

2.4 HP 对 ishikawa 细胞迁移能力的影响

与 Ct 组比较, HP-L 组、HP-H 组 ishikawa 细胞划痕愈合率降低 ($P < 0.05$); 与 Ct 组、si-NC 组比较, si-AEG-1 组 ishikawa 细胞划痕愈合率降低 ($P < 0.05$); 与 HP-H 组、HP-H + pcDNA 组比较, HP-H + pcDNA-AEG-1 组 ishikawa 细胞划痕愈合率升高 ($P < 0.05$)。见图 3 及表 4。

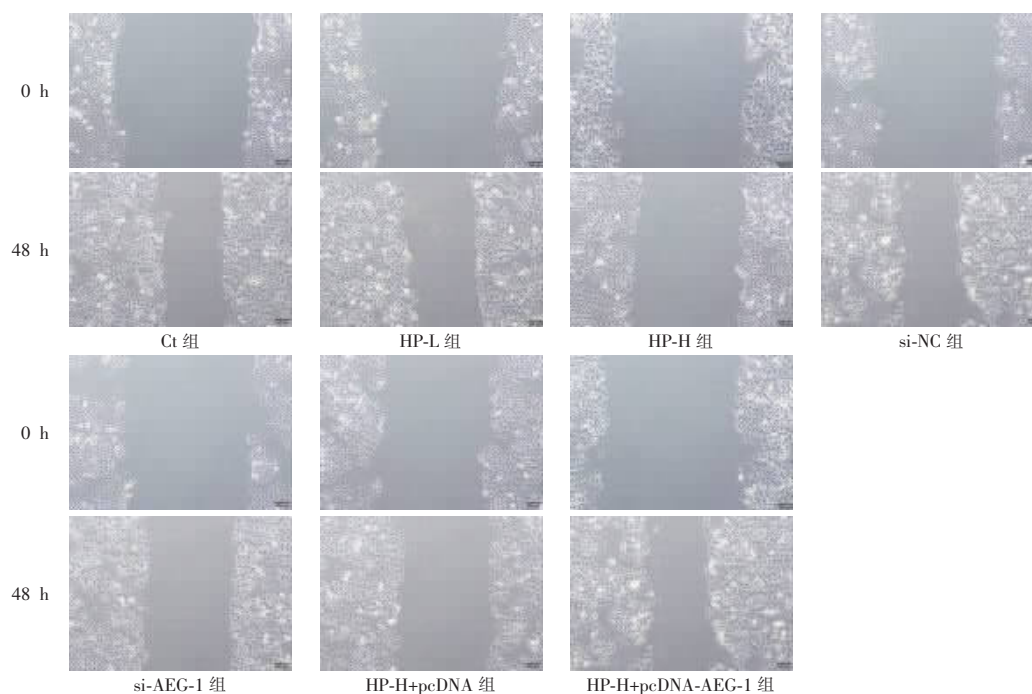


图3 划痕实验检测 ishikawa 细胞迁移

表4 各组 ishikawa 细胞划痕愈合率比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 划痕愈合率(%) |
|----------------------|----------------|
| Ct 组 | 56.52 ± 3.29 |
| HP-L 组 | 43.35 ± 2.55* |
| HP-H 组 | 21.14 ± 1.82*# |
| si-NC 组 | 55.57 ± 3.32 |
| si-AEG-1 组 | 24.49 ± 2.07*▲ |
| HP-H + pcDNA 组 | 20.12 ± 2.11 |
| HP-H + pcDNA-AEG-1 组 | 37.72 ± 2.26△& |

* $P < 0.05$, 与 Ct 组比较; # $P < 0.05$, 与 HP-L 组比较; △ $P < 0.05$, 与 HP-H 组比较; ▲ $P < 0.05$, 与 si-NC 组比较; & $P < 0.05$, 与

HP-H + pcDNA 组比较。

2.5 HP 对 ishikawa 细胞侵袭能力的影响

与 Ct 组比较, HP-L 组、HP-H 组侵袭细胞数降低 ($P < 0.05$); 与 Ct 组、si-NC 组比较, si-AEG-1 组侵袭细胞数降低 ($P < 0.05$); 与 HP-H 组、HP-H + pcDNA 组比较, HP-H + pcDNA-AEG-1 组侵袭细胞数升高 ($P < 0.05$)。见图 4 及表 5。

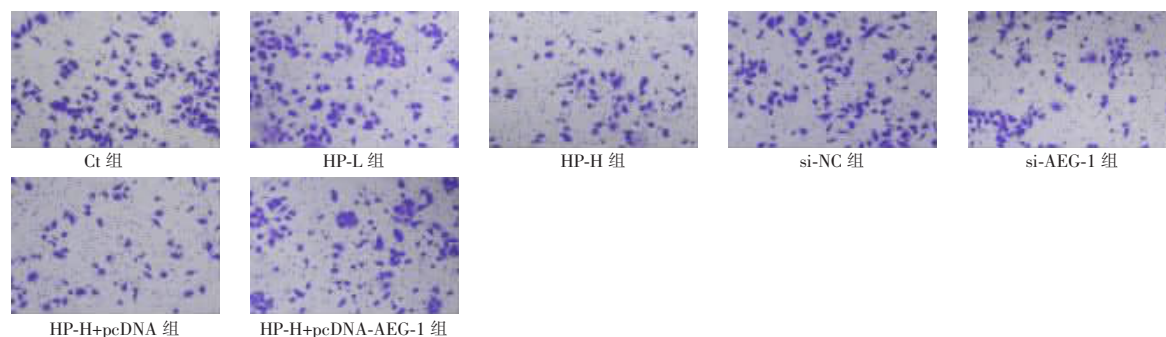


图4 Transwell 检测 ishikawa 细胞侵袭(200×)

表5 各组 ishikawa 细胞侵袭细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 侵袭细胞数(个) |
|----------------------|----------------|
| Ct 组 | 87.12 ± 4.59 |
| HP-L 组 | 70.48 ± 4.36* |
| HP-H 组 | 26.65 ± 1.59*# |
| si-NC 组 | 85.86 ± 4.72 |
| si-AEG-1 组 | 28.83 ± 2.24*▲ |
| HP-H + pcDNA 组 | 25.58 ± 2.01 |
| HP-H + pcDNA-AEG-1 组 | 58.14 ± 2.77△& |

* $P < 0.05$, 与 Ct 组比较; # $P < 0.05$, 与 HP-L 组比较; △ $P < 0.05$, 与 HP-H 组比较; ▲ $P < 0.05$, 与 si-NC 组比较; & $P < 0.05$, 与 HP-H + pcDNA 组比较。

2.6 HP 对 ishikawa 细胞中相关蛋白表达的影响

与 Ct 组比较, HP-L 组、HP-H 组 ishikawa 细胞中 AEG-1、CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达降低, Bax、Caspase-3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与 Ct 组、si-NC 组比较, si-AEG-1 组 ishikawa 细胞中 AEG-1、CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达降低, Bax、Caspase-3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与 HP-H 组、HP-H + pcDNA 组比较, HP-H + pcDNA-AEG-1 组 ishikawa 细胞中 AEG-1、CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋

白表达升高, Bax、Caspase-3 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。见图 5 和表 6。

2.7 HP 对裸鼠体内肿瘤生长的影响

与裸鼠 Ct 组比较, 裸鼠 HP-L 组、裸鼠 HP-H 组裸鼠体内肿瘤质量降低 ($P < 0.05$); 与裸鼠 Ct 组、裸鼠 si-NC 组比较, 裸鼠 si-AEG-1 组裸鼠体内肿瘤质量降低 ($P < 0.05$); 与裸鼠 HP-H 组、裸鼠 HP-H + pcDNA 组比较, 裸鼠 HP-H + pcDNA-AEG-1 组裸鼠体内肿瘤质量升高 ($P < 0.05$)。见图 6 及表 7。

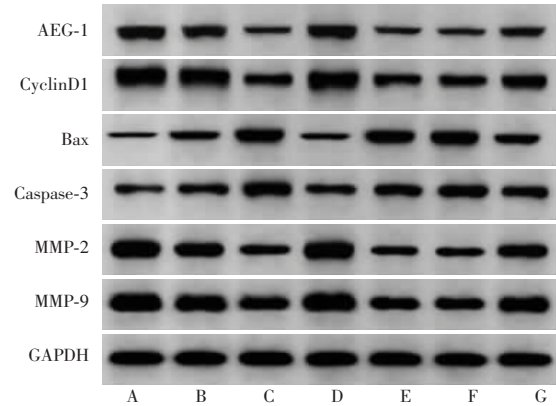


图 5 Western blot 检测 ishikawa 细胞中相关蛋白表达
A. Ct 组; B. HP-L 组; C. HP-H 组; D. si-NC 组; E. si-AEG-1 组; F. HP-H+pcDNA 组; G. HP-H+pcDNA-AEG-1 组。

表 6 各组 ishikawa 细胞中相关蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | AEG-1 | CyclinD1 | Bax | Caspase-3 | MMP-2 | MMP-9 |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Ct 组 | 1.67 ± 0.21 | 1.89 ± 0.24 | 0.27 ± 0.02 | 0.48 ± 0.03 | 1.95 ± 0.26 | 2.14 ± 0.33 |
| HP-L 组 | 1.41 ± 0.15* | 1.57 ± 0.18* | 0.46 ± 0.03* | 0.60 ± 0.05* | 1.56 ± 0.17* | 1.72 ± 0.19* |
| HP-H 组 | 0.36 ± 0.03*# | 0.59 ± 0.04*# | 1.08 ± 0.09*# | 1.36 ± 0.11*# | 0.59 ± 0.04*# | 0.84 ± 0.07*# |
| si-NC 组 | 1.64 ± 0.20 | 1.91 ± 0.26 | 0.29 ± 0.02 | 0.50 ± 0.05 | 1.96 ± 0.27 | 2.12 ± 0.30 |
| si-AEG-1 组 | 0.44 ± 0.03*▲ | 0.67 ± 0.05*▲ | 0.98 ± 0.09*▲ | 1.28 ± 0.08*▲ | 0.64 ± 0.05*▲ | 0.90 ± 0.08*▲ |
| HP-H + pcDNA 组 | 0.38 ± 0.03 | 0.60 ± 0.06 | 1.09 ± 0.10 | 1.37 ± 0.13 | 0.60 ± 0.05 | 0.86 ± 0.08 |
| HP-H + pcDNA-AEG-1 组 | 0.84 ± 0.07Δ& | 0.99 ± 0.08Δ& | 0.58 ± 0.04Δ& | 0.94 ± 0.08Δ& | 1.23 ± 0.10Δ& | 1.58 ± 0.11Δ& |

* $P < 0.05$, 与 Ct 组比较; # $P < 0.05$, 与 HP-L 组比较; Δ $P < 0.05$, 与 HP-H 组比较; ▲ $P < 0.05$, 与 si-NC 组比较; & $P < 0.05$, 与 HP-H + pcDNA 组比较。

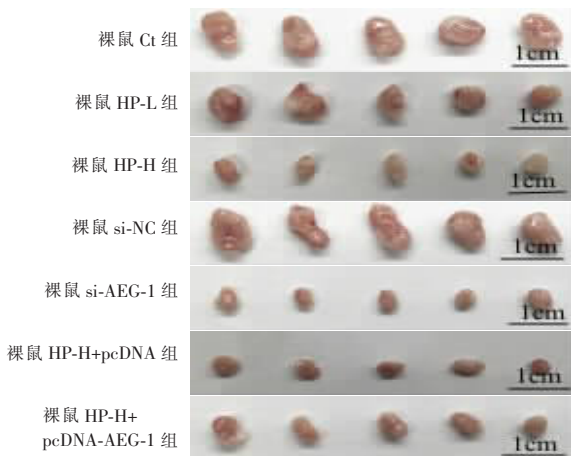


图 6 各组裸鼠体内肿瘤生长情况比较

表 7 各组裸鼠体内肿瘤质量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 肿瘤质量 (g) |
|-------------------------|---------------|
| 裸鼠 Ct 组 | 0.82 ± 0.07 |
| 裸鼠 HP-L 组 | 0.69 ± 0.06* |
| 裸鼠 HP-H 组 | 0.30 ± 0.02*# |
| 裸鼠 si-NC 组 | 0.83 ± 0.07 |
| 裸鼠 si-AEG-1 组 | 0.32 ± 0.02*▲ |
| 裸鼠 HP-H + pcDNA 组 | 0.31 ± 0.02 |
| 裸鼠 HP-H + pcDNA-AEG-1 组 | 0.55 ± 0.04Δ& |

* $P < 0.05$, 与裸鼠 Ct 组比较; # $P < 0.05$, 与裸鼠 HP-L 组比较; Δ $P < 0.05$, 与裸鼠 HP-H 组比较; ▲ $P < 0.05$, 与裸鼠 si-NC 组比较; & $P < 0.05$, 与裸鼠 HP-H + pcDNA 组比较。

3 讨论

EC 是一种以子宫内膜细胞无节制或异常生长为特征性疾病^[9]。相关研究^[10]表明, 2018 年全球报告了大约 38 万例新病例和 8 万例 EC 相关死亡病例, 且 EC 的发病率不断增加, 预后较差。因此, 迫切需要寻找有效的 EC 治疗策略。

HP 作为 Trametes robiniophila Murr 的提取物, 其具有抗肿瘤潜力和免疫调节作用^[11]。已有研究报道, HP 可抑制乳腺癌进展^[12]; HP 可诱导透明细胞肾细胞癌细胞凋亡, 阻碍增殖、迁移、侵袭^[13]。以上研究表明 HP 可抑制肿瘤的进展。本研究显示, HP 可抑制 ishikawa 细胞增殖、肿瘤生长、迁移与侵袭, 诱导凋亡, 且 HP 的剂量越高, 对应的趋势越明显, 表明 HP 在 EC 中发挥抑癌作用。CyclinD1 是衡量细胞增殖的常用指标, 其表达量越高表明细胞增殖能力越强^[14]; Bax、Caspase-3 是细胞凋亡相关蛋白, 增加 Bax、Caspase-3 水平可促进细胞凋亡^[15]; 基质金属蛋白酶可促进细胞迁移和侵袭, 作为基质金属蛋白酶家族的成员, MMP-2 和 MMP-9 在肿瘤中均具有高度活性, 同时也能促进细胞迁移和侵袭^[16]。本研究显示, 低、高剂量 HP 均可抑制 ishikawa 细胞中 CyclinD1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达, 促进 Bax、Caspase-3 蛋白表达, 证实了 HP 具有抑制 ish-

ishikawa 细胞增殖、迁移与侵袭,诱导细胞凋亡的作用。

AEG-1 是促进肿瘤发展的关键因素,其可通过促进细胞增殖与转移、提高抗凋亡能力,进而加速肿瘤的进展^[17]。据报道,AEG-1 在肝癌细胞中高表达,并促进了肝癌细胞的转移^[18];沉默 AEG-1 抑制了非小细胞肺癌细胞增殖、迁移、侵袭^[19];EC 组织中 AEG-1 表达增高,并可促进肿瘤组织的淋巴结转移^[20]。以上研究表明 AEG-1 在多种肿瘤中具有促癌的作用。本研究显示,AEG-1 蛋白在 ishikawa 细胞中高表达,沉默 AEG-1 可抑制 ishikawa 细胞增殖、肿瘤生长、侵袭与迁移,诱导细胞凋亡,且低、高剂量 HP 均可抑制 ishikawa 细胞中 AEG-1 蛋白表达,推测 HP 可能通过下调 AEG-1 抑制 ishikawa 细胞生长、侵袭与迁移,诱导凋亡。为了验证该推测,本研究在高剂量 HP 作用的基础上再加上 pcDNA-AEG-1 干预 ishikawa 细胞或注射 ishikawa 细胞的裸鼠。结果显示,pcDNA-AEG-1 减弱了高剂量 HP 对 ishikawa 细胞增殖、迁移与侵袭的抑制作用、细胞凋亡的促进作用及对裸鼠体内肿瘤生长的抑制作用。证实了 HP 可能通过下调 AEG-1 抑制 ishikawa 细胞增殖、肿瘤生长、侵袭与迁移,诱导凋亡。

综上,HP 可能通过下调 AEG-1 抑制 ishikawa 细胞增殖、肿瘤生长、侵袭与迁移,诱导凋亡。其具体机制还待更深入的研究。

参考文献

[1] Winterhoff B, Thomaier L, Mullany S, *et al.* Molecular characterization of endometrial cancer and therapeutic implications[J]. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 2020, 32(1): 76–83.

[2] He Y, Xu S, Qi Y, *et al.* Long noncoding RNA SNHG25 promotes the malignancy of endometrial cancer by sponging microRNA-497-5p and increasing FASN expression[J]. *Journal of Ovarian Research*, 2021, 14(1): 163–175.

[3] Liao L, Chen Y, Zhou J, *et al.* microRNA-133b inhibits nTumor cell proliferation, migration and invasion by targeting SUMO1 in endometrial carcinoma[J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2021, 20(1): 15330338211065241.

[4] 王明浩. 槐耳多糖抑制三阴性乳腺癌侵袭转移能力的作用及机制研究[D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2020.

[5] Qi J, Xie FJ, Liu S, *et al.* Huaier Granule combined with tegafur gimeracil oteracil potassium promotes stage IIb gastric cancer prognosis and induces gastric cancer cell apoptosis by regulating livin[J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 2403595–2403604.

[6] 庞岚, 曾倩, 武学锋, 等. AEG-1 表达与子宫内膜癌侵袭、转移的相关性研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(8): 810–814.

[7] Zheng J, Li C, Wu X, *et al.* Huaier polysaccharides suppresses hepatocarcinoma MHCC97-H cell metastasis via inactivation of EMT and AEG-1 pathway[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, 64: 106–110.

[8] Tian Y, Wu J, Zeng L, *et al.* Huaier polysaccharides suppress triple-negative breast cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition by inducing autophagic degradation of Snail[J]. *Cell & Bioscience*, 2021, 11(1): 170–184.

[9] Zhao H, Zhang X. Sugiol suppresses the growth, migration, and invasion of human endometrial cancer cells via induction of apoptosis and autophagy[J]. *3 Biotech*, 2021, 11(5): 1–9.

[10] la Rubia ECD, Martinez-Garcia E, Dittmar G, *et al.* Prognostic biomarkers in endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, 9(6): 1900–1919.

[11] Fang L, Zhang Y, Wang Q, *et al.* A polysaccharide from Huaier ameliorates cisplatin nephrotoxicity by decreasing oxidative stress and apoptosis via PI3K/AKT signaling[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 139(1): 932–943.

[12] Li C, Wang X, Chen T, *et al.* Trametes robiniophila Murr in the treatment of breast cancer[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 128: 110254–110263.

[13] Fang L, Zhang Y, Zang Y, *et al.* HP-1 inhibits the progression of ccRCC and enhances sunitinib therapeutic effects by suppressing EMT[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 223: 115109–115121.

[14] Tu F, Li MF, Chen YY, *et al.* Let-7i-3p inhibits the cell cycle, proliferation, invasion, and migration of colorectal cancer cells via downregulating CCND1 [J]. *Open Medicine*, 2022, 17(1): 1019–1030.

[15] Wang Z, Chen X, Liu N, *et al.* A nuclear long non-coding RNA LINC00618 accelerates ferroptosis in a manner dependent upon apoptosis[J]. *Molecular Therapy*, 2021, 29(1): 263–274.

[16] Zhao Q, Zhang B, Li Z, *et al.* Effects of lncRNA PROX1-AS1 on proliferation, migration, invasion and apoptosis of lung cancer cells by regulating miR-1305 [J]. *Journal of Healthcare Engineering*, 2022, 2022: 9570900.

[17] Khan M, Sarkar D. The scope of astrocyte elevated gene-1/metadherin (AEG-1/MTDH) in cancer clinicopathology: a review[J]. *Genes*, 2021, 12(2): 308–320.

[18] Zhu HD, Liu L, Deng H, *et al.* Astrocyte elevated gene 1 (AEG-1) promotes anoikis resistance and metastasis by inducing autophagy in hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(6): 5084–5095.

[19] Li YH, Xu CL, He CJ, *et al.* circMTDH. 4/miR-630/AEG-1 axis participates in the regulation of proliferation, migration, invasion, chemoresistance, and radioresistance of NSCLC [J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2020, 59(2): 141–153.

[20] 沈艳峰, 郑卫海, 张雪慧, 等. 子宫内膜癌中星形细胞上调基因-1、雌激素受体表达临床病理意义[J]. *临床军医杂志*, 2020, 48(8): 967–969.

(收稿日期: 2023-05-12

修回日期: 2023-06-13)