

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202625279

· 鼻咽癌专栏 ·

连翘苷调控 miR-34c-5p 表达对鼻咽癌细胞 CNE-1、CNE-2 凋亡的影响及作用机制分析

宋之瑶¹, 赵建云¹, 曹汉海¹, 陈文静², 朱凤娟¹, 牟军伟¹, 李建胜¹, 刘伟³, 于洋³

(1. 日照市人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 山东日照 276800; 2. 日照市人民医院泰安路社区卫生服务站, 山东日照 276800; 3. 日照市人民医院普外科, 山东日照 276800)

摘要: **目的** 探究连翘苷通过调控微小 RNA-34c-5p (miR-34c-5p) 表达对鼻咽癌 (NPC) 细胞系 CNE-1、CNE-2 增殖抑制及凋亡诱导的影响及其作用机制。**方法** 体外培养 NPC 细胞 CNE-1、CNE-2, 采用 MTT 法筛选连翘苷对 NPC 细胞增殖的作用浓度。将 CNE-1、CNE-2 细胞分别分为对照组、连翘苷组、阴性对照模拟物 (miR-NC) 组、miR-34c-5p 模拟物 (miR-34c-5p) 组、连翘苷+阴性对照抑制剂 (in-miR-NC) 组和连翘苷+miR-34c-5p 抑制剂 (in-miR-34c-5p) 组。采用集落形成实验、EdU 法、TUNEL 法及流式细胞术检测各组细胞的增殖与凋亡情况, 利用 Western blot 检测各组 NPC 细胞增殖与凋亡相关蛋白的表达。**结果** CNE-1 和 CNE-2 细胞增殖活力随着连翘苷浓度的升高呈剂量依赖性降低 ($P < 0.05$), 8 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷对 CNE-1 和 CNE-2 细胞增殖活力的抑制率接近 50%。与对照组比较, 连翘苷组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 miR-34c-5p 表达、TUNEL 阳性细胞率、细胞凋亡率、p53 水平及 FasL 水平均显著升高, 集落形成、EdU 阳性细胞比例、c-Myc、PCNA、Survivin 均降低 ($P < 0.05$); 与 miR-NC 组比较, miR-34c-5p 组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 miR-34c-5p 表达、TUNEL 阳性细胞率、细胞凋亡率、p53 水平、FasL 水平均升高, 集落形成、EdU 阳性细胞比例、c-Myc、PCNA、Survivin 均降低 ($P < 0.05$); 与连翘苷+in-miR-NC 组比较, 连翘苷+in-miR-34c-5p 组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 miR-34c-5p 表达、TUNEL 阳性细胞率、细胞凋亡率、p53 水平、FasL 水平均降低, 集落形成、EdU 阳性细胞比例、c-Myc、PCNA、Survivin 均升高 ($P < 0.05$)。**结论** 连翘苷可通过上调 miR-34c-5p 表达, 有效抑制 NPC 细胞 CNE-1 和 CNE-2 增殖并促进细胞凋亡。

关键词: 鼻咽癌细胞; 连翘苷; miR-34c-5p; 增殖; 凋亡

中图分类号: R739.63

The effect and mechanism of pilyrin on apoptosis of nasopharyngeal carcinoma CNE-1 and CNE-2 cells by regulating miR-34c-5p

SONG Zhiyao¹, ZHAO Jianyun¹, CAO Hanhai¹, CHEN Wenjing², ZHU Fengjuan¹, MOU Junwei¹, LI Jiansheng¹, LIU Wei³, YU Yang³

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, People's Hospital of Rizhao, Rizhao 276800, China; 2. Tai'an Road Community Health Service Station, People's Hospital of Rizhao, Rizhao 276800, China; 3. Department of General Surgery, People's Hospital of Rizhao, Rizhao 276800, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect and mechanism of pilyrin on the proliferation inhibition and apoptosis induction of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell lines CNE-1 and CNE-2 by regulating the expression of microRNA-34c-5p (miR-34c-5p). **Methods** CNE-1 and CNE-2 cells were cultured, and the effect of pilyrin on the proliferation activity of NPC cells was screened by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The CNE-1 and CNE-2 cells were respectively assigned into control group, pilyrin group, negative control mimic (miR-NC) group, miR-34c-5p mimic (miR-34c-5p) group, pilyrin + negative control inhibitor (in-miR-NC) group, and pilyrin + miR-34c-5p inhibitor (in-miR-34c-5p) group. The colony formation assay, EdU method, TUNEL method and flow cytometry were used to detect the proliferation

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目 (202204010899); 日照市中医药科技项目 (RZY2024B02)。

第一作者简介: 宋之瑶, 女, 硕士, 主治医师。

通信作者简介: 赵建云, 女, 硕士, 主治医师。

and apoptosis of cells in each group. Western blot was adopted to analyze the expression of proliferation and apoptosis-related proteins in NPC cells of each group. **Results** The proliferation activities of CNE-1 and CNE-2 cells decreased with the increase of pilyrin concentration ($P < 0.05$). At 8 $\mu\text{mol/L}$ of pilyrin, the inhibitory ability of the proliferation activities of CNE-1 and CNE-2 was close to 50%. Compared with the control group, the expression of miR-34c-5p, the rate of TUNEL positive cells, the apoptosis rate, the level of p53, and the level of FasL in CNE-1 and CNE-2 cells of the pilyrin group were all increased, while the colony formation, the proportion of EdU positive cells, c-Myc, PCNA, and Survivin were all decreased ($P < 0.05$). Compared with the miR-NC group, the expression of miR-34c-5p, the rate of TUNEL positive cells, the apoptosis rate, the level of p53, and the level of FasL in CNE-1 and CNE-2 cells of the miR-34c-5p group were all increased, while the colony formation, the proportion of EdU positive cells, c-Myc, PCNA, and Survivin were all decreased ($P < 0.05$). Compared with the pilyrin + in-miR-NC group, the expression of miR-34c-5p, the rate of TUNEL positive cells, the apoptosis rate, the level of p53, and the level of FasL in CNE-1 and CNE-2 cells of the pilyrin+in-miR-34c-5p group were all decreased, while the colony formation, the proportion of EdU positive cells, c-Myc, PCNA, and Survivin were all increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Pilyrin can effectively promote the proliferation of NPC cells CNE-1 and CNE-2 and promote their apoptosis by up-regulating the expression of miR-34c-5p.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma cells; Pilyrin; MiR-34c-5p; Proliferation; Apoptosis

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种发生于鼻咽黏膜上皮的恶性肿瘤,在我国南方地区发病率较高^[1]。由于 NPC 发病位置隐匿,早期症状不典型,多数患者确诊时已进展为中晚期,不仅增大了治疗难度,而且预后情况不容乐观^[2]。目前, NPC 的治疗主要涵盖手术、放疗以及综合治疗等方面。然而,由于高耐药性和高复发率的存在,其治疗效果难以快速提高^[3]。因此迫切需要挖掘新的治疗靶点,开发有效的、无副作用的治疗药物。

连翘苷是一种从传统中药连翘中提取的具有抗炎、抗病毒等多种生理活性的化合物。已有大量研究证实,连翘苷可通过多靶点机制抑制肺癌、肝癌等多个肿瘤细胞的增殖,并诱导细胞凋亡来发挥抗癌功能^[4-5]。例如李绍霄等^[6]研究证实,连翘苷可通过上调微小 RNA-545-3p 抑制 NPC 细胞生长,促进 NPC 细胞铁死亡进而发挥抗癌效应。值得注意的是,微小 RNA (microRNA, miRNA) 在肿瘤中常形成复杂调控网络,同一药物可通过不同 miRNA 介导多重生物学效应^[7]。微小 RNA-34c-5p (miRNA-34c-5p, miR-34c-5p) 作为一种在 NPC 细胞中明显下调的 miRNA,前期研究证实,抑制 miR-34c-5p 的表达可通过靶向 FOS 样抗原 1 促进 NPC 的恶性行为^[8]。基于上述研究,本研究推测连翘苷可通过上调 miR-34c-5p 表达从而在 NPC 中发挥抗癌功能,这一假设不仅揭示了连翘苷的抗癌机制,也为 NPC 的多途径治疗提供了新视角。

鉴于 miR-34c-5p 和连翘苷之间潜在的抗癌特性,推测连翘苷可通过调控 miR-34c-5p 表达影响 NPC 的生长和死亡。本研究通过分析连翘苷对

NPC 细胞 CNE-1 和 CNE-2 增殖和凋亡以及对 miR-34c-5p 表达的影响来分析连翘苷在 NPC 中的具体作用机制,旨在为 NPC 的治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人 NPC 细胞系 CNE-1 (CM-H361) 和 CNE-2 (CM-H362), 购自美国 ATCC。连翘苷 (纯度 $\geq 97\%$, F104482) 购自上海阿拉丁; miR-34c-5p 模拟物 (miR-34c-5p)、阴性对照模拟物 (miR-NC)、miR-34c-5p 抑制剂 (in-miR-34c-5p) 及阴性对照抑制剂 (in-miR-NC) 均由上海生工定制合成; MTT 试剂 (C0009M)、结晶紫 (C0121)、EdU 试剂 (ST067)、TUNEL 试剂 (C1082)、RIPA 试剂 (P0013D) 均购自上海碧云天; 一抗 c-Myc (5605)、PCNA (2586)、Survivin (2803)、p53 (9282)、FasL (68405) 均购自美国 CST。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 CNE-1 和 CNE-2 细胞均使用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI1640 培养基培养, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养后更换培养基, 待细胞密度超过 80% 时进行后续实验。

1.2.2 MTT 法检测 将对数增殖期的 CNE-1 和 CNE-2 细胞以 5 000 个细胞的密度接种于 96 孔细胞板中, 每孔体积是 200 μL , 常规培养 24 h 细胞贴壁后, 使用不同浓度的连翘苷 (0、2、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$)^[6] 替换培养基, 继续培养 48 h, 在实验结束前 4 h 相应添加 10 μL MTT 溶液, 孵育后替换为 150 μL DMSO, 振荡 10 min。通过酶标仪在 490 nm

处检测各孔细胞吸光度值,并计算细胞增殖活力。

1.2.3 细胞分组 将 CNE-1 和 CNE-2 细胞分为对照组(常规培养)、连翘苷组(8 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷)、miR-NC 组(转染 miR-NC)、miR-34c-5p 组(转染 miR-34c-5p)、连翘苷+in-miR-NC 组(转染 in-miR-NC 24 h 后 8 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷处理)和连翘苷+in-miR-34c-5p 组(转染 in-miR-34c-5p 24 h 后 8 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷处理)。各组细胞均处理 48 h。

1.2.4 qRT-PCR 检测 收集分组处理的 CNE-1 和 CNE-2 细胞,提取 RNA 后逆转录为 cDNA,结合 qRT-PCR 试剂盒和 miR-34c-5p 引物进行扩增。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 表示 miR-34c-5p 的相对表达水平。miR-34c-5p 引物序列:5'-GCGCATCCCTTGCATGGT-3'和 5'-AGTGCAGGTCCGAGGTATT-3'; U6 引物序列:5'-GGAACGATACAGAGAAGATTAGC-3'和 5'-TGG-AACGCTTCACGAATTTGCG-3'。

1.2.5 细胞增殖检测 集落形成实验:将分组处理的 CNE-1 和 CNE-2 细胞以每孔 200 个接种于 6 孔板,培养 2 周至肉眼可见的克隆时去除培养基,多聚甲醛固定后用结晶紫染色。晾干后进行集落计数。EdU 实验:将分组处理的 CNE-1 和 CNE-2 细胞以每孔 1×10^5 个接种到 96 孔板中,培养 24 h,每孔添加 100 μL EdU 染色液孵育 2 h。去除培养基,用多聚甲醛固定后 DAPI 染色 10 min,在荧光显微镜下对 EdU 阳性细胞数进行统计。

1.2.6 细胞凋亡检测 TUNEL 实验:将分组处理的 CNE-1 和 CNE-2 细胞以每孔 1×10^6 个接种到 6 孔板中,培养 24 h 后,收集细胞。使用 TUNEL 染色液染色 1 h 后在荧光显微镜下观察并对 TUNEL 阳性细胞数进行统计。流式细胞术:将分组处理的 CNE-1 和 CNE-2 细胞以每孔 1×10^5 个接种到 24 孔板中,培养 24 h 后收集细胞,分别使用 Annexin FITC/PI 处理后经流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.7 细胞蛋白检测 收集分组处理的 CNE-1 和 CNE-2 细胞,提取总蛋白。将蛋白变性后经电泳转移到 PVDF 膜上,使用 5%脱脂牛奶封闭 2 h。分别添加一抗 c-Myc、PCNA、Survivin、p53、FasL 进行过夜孵育,隔天补充相应二抗孵育后进行显影。最后在凝胶成像系统中拍照,并计算蛋白的灰度值进行半定量分析。

1.3 统计学分析

实验数据使用 GraphPad Prism 8.0.1 进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较采用单因素方差分析(SNK- q 检验)。 $P < 0.05$ 为差异具有统计

学意义。

2 结果

2.1 连翘苷对 NPC 细胞增殖活力的影响

CNE-1 和 CNE-2 细胞增殖活力随着连翘苷浓度的升高而降低($F_1 = 133.5$ 、 $F_2 = 135.0$, $P < 0.05$),并且在连翘苷 8 $\mu\text{mol/L}$ 时,对 CNE-1 和 CNE-2 细胞增殖活力的抑制能力接近 50%,故选用此浓度作为后续实验浓度。见图 1。

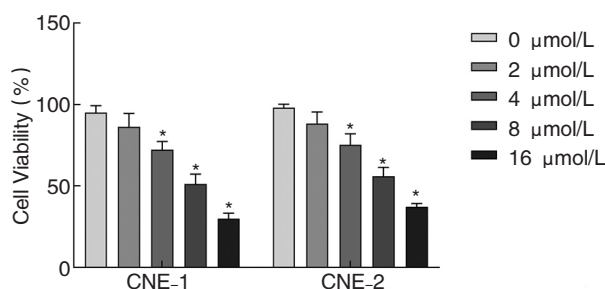


图 1 MTT 法检测不同浓度连翘苷对 CNE-1 和 CNE-2 细胞增殖活力 注: * $P < 0.05$ vs. 连翘苷 0 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 各组 NPC 细胞 miR-34c-5p 表达及增殖情况分析

与对照组比较,连翘苷组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 miR-34c-5p 表达升高,集落形成和 EdU 阳性细胞比例降低($q = 12.56$ 和 13.51 、 18.40 和 20.37 、 21.33 和 21.71 , P 均 < 0.05);与 miR-NC 组比较,miR-34c-5p 组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 miR-34c-5p 表达升高,集落形成和 EdU 阳性细胞比例降低($q = 18.22$ 和 21.65 、 17.85 和 20.06 、 19.98 和 20.85 , P 均 < 0.05);与连翘苷+in-miR-NC 组比较,连翘苷+in-miR-34c-5p 组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 miR-34c-5p 表达降低,集落形成和 EdU 阳性细胞比例升高($q = 7.25$ 和 7.001 、 12.26 和 10.71 、 11.06 和 10.19 , P 均 < 0.05)。见图 2。

2.3 各组 NPC 细胞凋亡情况分析

与对照组比较,连翘苷组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 TUNEL 阳性细胞率和细胞凋亡率均升高($q = 22.73$ 和 18.11 、 18.62 和 22.75 , P 均 < 0.05);与 miR-NC 组比较,miR-34c-5p 组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 TUNEL 阳性细胞率和细胞凋亡率均升高($q = 19.54$ 和 16.63 、 23.68 和 21.84 , P 均 < 0.05);与连翘苷+in-miR-NC 组比较,连翘苷+in-miR-34c-5p 组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 TUNEL 阳性细胞率和细胞凋亡率均降低($q = 18.65$ 和 11.74 、 16.80 和 18.06 , P 均 < 0.05)。见图 3。

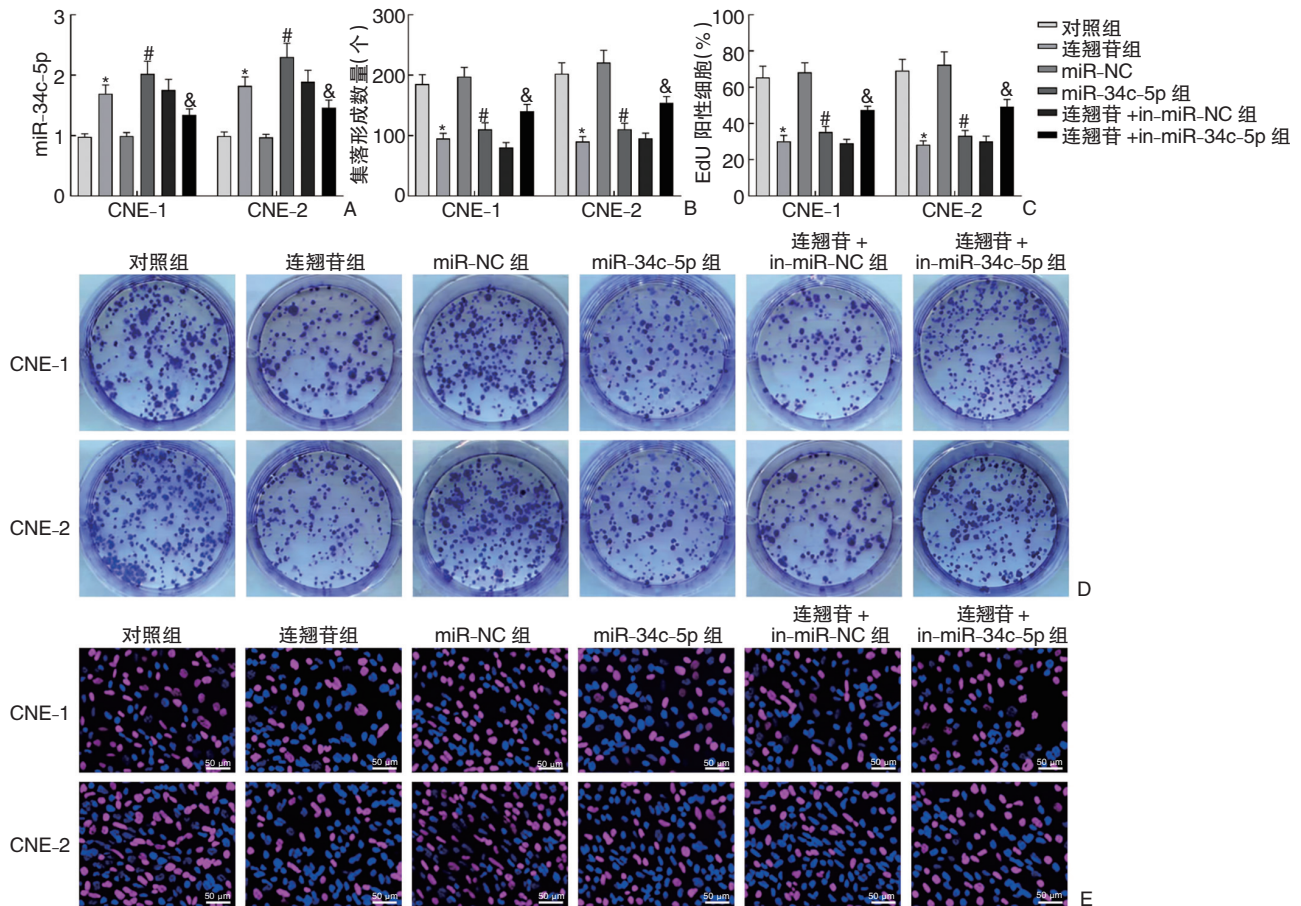


图 2 连翘苷对 NPC 细胞增殖的影响 A: 各组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 miR-34c-5p 表达柱状图; B: 各组 CNE-1 和 CNE-2 细胞集落形成数量柱状图; C: 各组 CNE-1 和 CNE-2 细胞 EdU 阳性率柱状图; D: 各组 CNE-1 和 CNE-2 细胞集落形成数量 (结晶紫 $\times 200$); E: 各组 CNE-1 和 CNE-2 细胞 EdU 阳性率 (EdU $\times 200$) 注: * $P < 0.05$ vs. 对照组; # $P < 0.05$ vs. miR-NC 组; & $P < 0.05$ vs. 连翘苷+in-miR-NC 组。下同。

2.4 各组 NPC 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达

与对照组比较,连翘苷组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 c-Myc、PCNA、Survivin 蛋白水平降低, p53、FasL 蛋白水平升高 ($q = 27.14$ 和 24.96 , 27.08 和 29.79 , 32.40 和 29.14 , 23.84 和 24.33 , 31.70 和 24.76 , P 均 < 0.05); 与 miR-NC 组比较, miR-34c-5p 组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 c-Myc、PCNA、Survivin 蛋白水平降低, p53、FasL 蛋白水平升高 ($q = 30.75$ 和 29.05 , 28.04 和 29.79 , 32.40 和 29.14 , 25.90 和 24.73 , 32.75 和 27.12 , P 均 < 0.05); 与连翘苷 + in-miR-NC 组比较, 连翘苷 + in-miR-34c-5p 组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 c-Myc、PCNA、Survivin 蛋白水平升高, p53、FasL 蛋白水平降低 ($q = 12.21$ 和 12.28 , 12.09 和 14.90 , 14.18 和 12.24 , 16.03 和 16.62 , 17.43 和 14.94 , P 均 < 0.05)。见图 4、表 1。

3 讨论

NPC 是一种高发的头颈部恶性肿瘤, 早期无明显特异性, 致使多数患者确诊即为晚期^[9], 在增大疾病治疗难度的同时也降低了治疗的有效性。随着现阶段精准医疗和免疫治疗的快速发展, 虽然肿瘤的耐药和复发问题得到了缓解, 但依旧是疾病治疗的主要瓶颈, 5 年内患者的生存率难以得到改善^[2-3]。CNE-1 和 CNE-2 均为低分化 NPC 细胞株, 可能共享相似的蛋白表达谱 (如 c-Myc、p53), 但在实验过程中通过细胞形态、生长曲线及功能实验 (如增殖能力差异) 以确认细胞株。因此, 以 CNE-1 和 CNE-2 为基础, 探寻高效和低毒性的药物是当前 NPC 临床治疗急需攻克的关键难题。

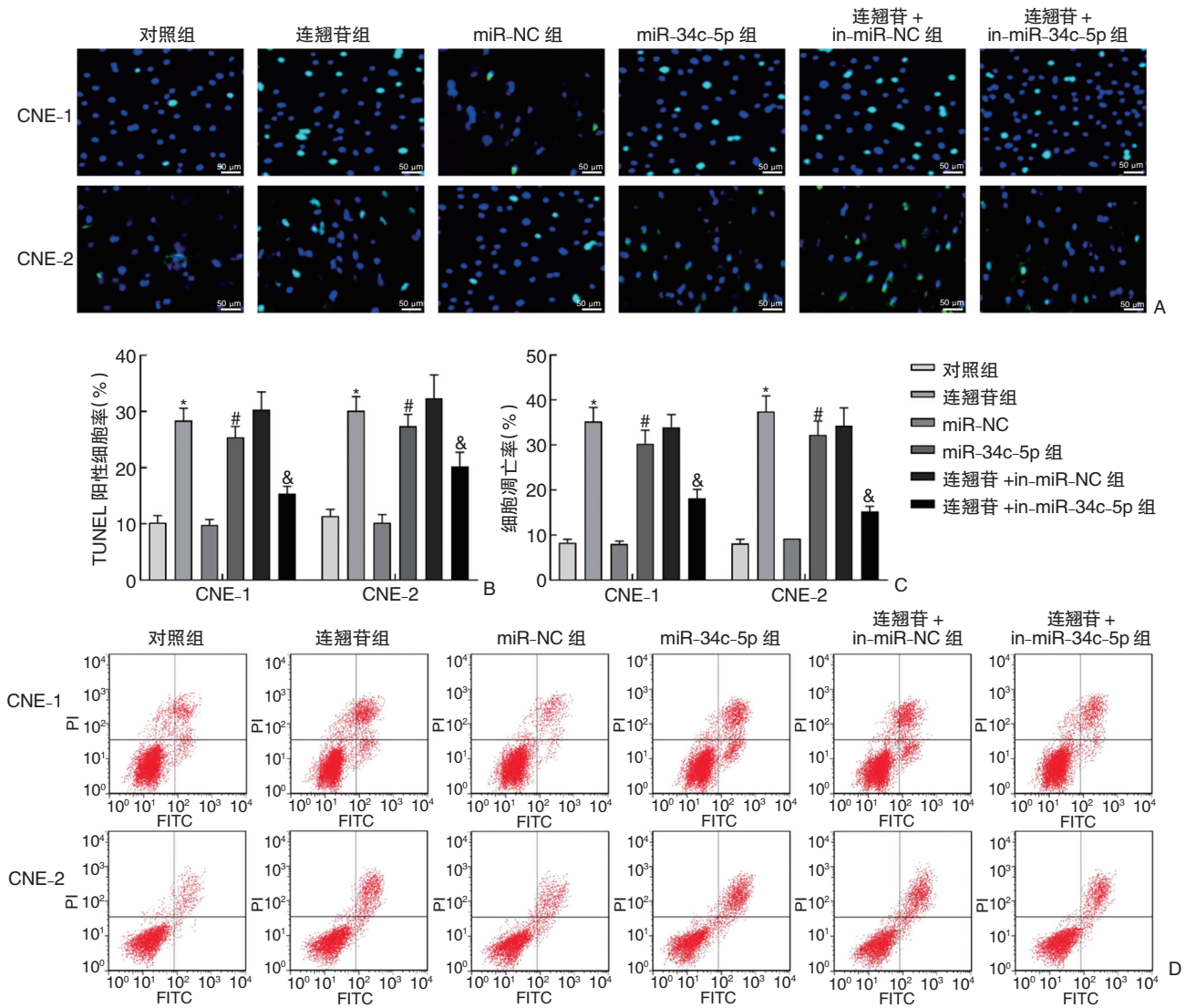


图 3 连翘苷对 NPC 细胞凋亡的影响 A:各组 CNE-1 和 CNE-2 细胞 TUNEL 阳性细胞率 (TUNEL $\times 200$);B:各组 CNE-1 和 CNE-2 细胞 TUNEL 阳性细胞率柱状图;C:各组 CNE-1 和 CNE-2 细胞凋亡率柱状图;D:各组 CNE-1 和 CNE-2 细胞凋亡率 (Annexin FITC/PI $\times 200$)

连翘苷是一种从连翘中获取的木脂素糖苷,大量研究证实,其具有抗炎、抗氧化以及抗肿瘤等活性^[10]。比如,研究显示,连翘苷通过激活 Nrf2 信号通路抑制高糖诱导肾小球系膜细胞的氧化应激和炎症^[11]。Tang 等^[12]研究证实,连翘苷通过降低铁蛋白重链 1 和 SLC7A11 蛋白表达进而促进铁死亡进程,从而在非小细胞肺癌中发挥抗肿瘤活性。然而,连翘苷在 NPC 中的作用及其潜在机制,尚未得到清晰的报道。本研究首先通过严密的实验设计发现, NPC 细胞系 CNE-1 和 CNE-2 的增殖活力随着连翘苷浓度的升高呈现依赖性降低。而当连翘苷浓度超过 $8 \mu\text{mol/L}$ 时,对 NPC 细胞的抑制率接近 50%,这一结果初步证实了连翘苷在 NPC 治疗中的潜在价值,并且为后续研究确定了浓度。后续集落形成、

EdU 等实验证实了连翘苷对 NPC 细胞的增殖和凋亡具有调控作用。通过对相关蛋白 c-Myc、PCNA、Survivin、p53、FasL 的表达检测发现,连翘苷可明显抑制 c-Myc、PCNA、Survivin 蛋白水平,上调 p53、FasL 蛋白水平。据报道,原癌基因 c-Myc 在细胞增殖过程中发挥关键作用,可通过调控细胞周期相关基因的表达加速细胞增殖;PCNA 是 DNA 修复、合成中的关键蛋白,其表达水平为细胞的增殖提供了必要条件^[13]。Survivin 是凋亡家族的关键成员,通过抑制半胱天冬酶的活性进而抑制细胞凋亡,从而有效增强细胞的存活力;p53 和 FasL 作为肿瘤抑制因子,在细胞受到损伤无法修复时,可启动凋亡程序,招募凋亡相关蛋白从而抑制细胞发生癌变^[14-15]。

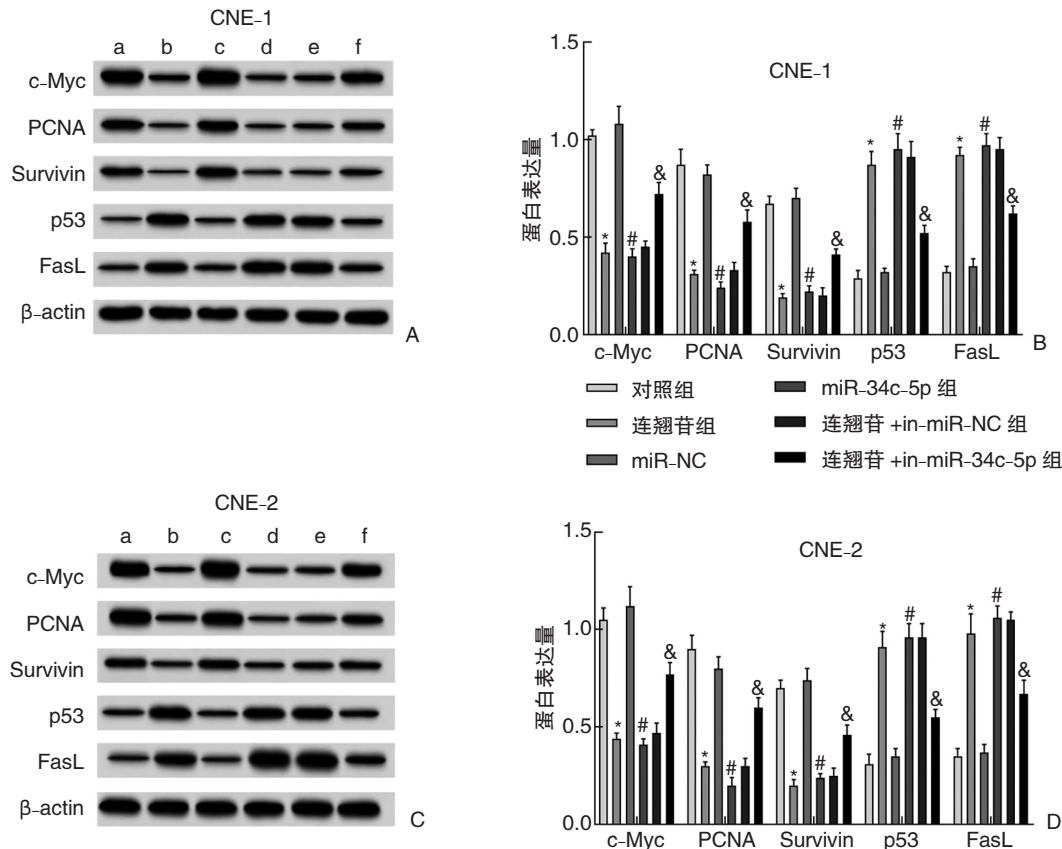


图 4 Western blot 检测各组 CNE-1(A、B)和 CNE-2(C、D)细胞中增殖、凋亡相关蛋白水平 注:a~f 依次表示为对照组、连翘苷组、miR-NC、miR-34c-5p 组、连翘苷+in-miR-NC 组和连翘苷+in-miR-34c-5p 组。

表 1 各组 CNE-1 和 CNE-2 细胞中 c-Myc、PCNA、Survivin、p53、FasL 表达检测 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	CNE-1				
	c-Myc	PCNA	Survivin	p53	FasL
对照组	1.02±0.03	0.87±0.08	0.67±0.04	0.29±0.04	0.32±0.03
连翘苷组	0.42±0.05 [*]	0.31±0.02 [*]	0.19±0.02 [*]	0.87±0.07 [*]	0.92±0.04 [*]
miR-NC	1.08±0.09	0.82±0.05	0.70±0.05	0.32±0.02	0.35±0.04
miR-34c-5p 组	0.40±0.04 [#]	0.24±0.03 [#]	0.22±0.03 [#]	0.95±0.08 [#]	0.97±0.06 [#]
连翘苷+in-miR-NC 组	0.45±0.03	0.33±0.04	0.20±0.04	0.91±0.08	0.95±0.06
连翘苷+in-miR-34c-5p 组	0.72±0.06 ^{&}	0.58±0.06 ^{&}	0.41±0.03 ^{&}	0.52±0.04 ^{&}	0.62±0.04 ^{&}
组别	CNE-2				
	c-Myc	PCNA	Survivin	p53	FasL
对照组	1.05±0.06	0.90±0.07	0.70±0.04	0.31±0.05	0.35±0.04
连翘苷组	0.44±0.03 [*]	0.30±0.02 [*]	0.20±0.03 [*]	0.91±0.08 [*]	0.98±0.10 [*]
miR-NC	1.12±0.10	0.84±0.06	0.74±0.06	0.35±0.04	0.37±0.04
miR-34c-5p 组	0.41±0.03 [#]	0.26±0.04 [#]	0.24±0.02 [#]	0.96±0.07 [#]	1.06±0.06 [#]
连翘苷+in-miR-NC 组	0.47±0.05	0.35±0.04	0.25±0.04	0.96±0.07	1.05±0.04
连翘苷+in-miR-34c-5p 组	0.77±0.06 ^{&}	0.62±0.05 ^{&}	0.46±0.05 ^{&}	0.55±0.04 ^{&}	0.67±0.07 ^{&}

近年来,随着对非编码 RNA 的研究不断深入,miRNA 的作用也逐渐凸显出来。众多研究证实,miRNA 的表达失调与肿瘤细胞的增殖和凋亡密切相关^[16]。比如,miR-92b-3p 在放疗敏感的 NPC 患者中明显高表达,且与患者预后良好相关,上调其表达可通过靶向 FHL2 抑制 NPC 细胞的增殖和集落

形成^[17]。Jin 等^[18]研究发现,miR-22-3p 在 NPC 组织和细胞中低表达,可通过调控 FOXP1 促进肿瘤细胞活力和迁移。此外,miR-34c-5p 已被证实 NPC 中低表达,可通过作为 *circ-NOTCH1* 下游基因参与 NPC 恶性表型的发展过程^[19]。上述结果提示,多个 miRNA 可能通过介导不同的抗肿瘤机制参与 NPC

发展。本研究在此基础上对 NPC 细胞中 miR-34c-5p 的表达进行上调发现,其表达升高可通过下调 c-Myc、PCNA、Survivin 蛋白和上调 p53、FasL 蛋白进而抑制 CNE-1 和 CNE-2 增殖,促进 CNE-1 和 CNE-2 细胞凋亡。同时发现,连翘苷处理后 miR-34c-5p 的表达也得到了明显的上调,提示连翘苷极有可能通过上调 miR-34c-5p 参与 NPC 恶性行为的调控过程。为了进一步探究其内在机制,本研究在连翘苷处理的同时抑制了 miR-34c-5p 的表达,结果显示,下调 miR-34c-5p 表达可明显削弱连翘苷对 CNE-1 和 CNE-2 细胞增殖和凋亡的影响,证实了连翘苷通过抑制细胞增殖、促进细胞凋亡进而缓解 NPC 恶性行为。

综上,本研究结果显示,连翘苷可通过上调 miR-34c-5p 的表达,抑制 NPC 细胞 CNE-1 和 CNE-2 增殖并促进细胞凋亡。本研究虽然采用了两种细胞系对连翘苷的功能及机制进行了探究,但仍然存在一定的不足。比如,并未明确 miR-34c-5p 的下游具体靶基因,同时也并未系统地进行体内病理学研究。因此,未来研究需围绕上述不足,进行多方面研究来完善连翘苷在 NPC 治疗中的临床转化。

参考文献:

- [1] Su ZY, Siak PY, Lwin YY, et al. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma: current insights and future outlook[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2024, 43(3):919-939.
- [2] Hsu CL, Chang YS, Li HP. Molecular diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: Past and future[J]. *Biomed J*, 2025, 48(1):100748.
- [3] 冯谢敏, 宋炜, 马军伟, 等. 调强放射治疗未分化型鼻咽癌的疗效及治疗前后血清 sE-cad 与 PDGF 水平变化探讨[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2023, 29(6):22-27.
- [4] Tang X, Teng J, Lu K. Phillyrin sensitizes lung cancer cells to ferroptosis through inhibiting FTH1/SLC7A11 axis[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2024, 62(1):8-19.
- [5] Zhu Y, Huang F, Liu X, et al. Phillyrin regulates the JAK2/STAT3 signaling pathway by inhibiting TOP2A expression to accelerate ferroptosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2025, 53(4):43.
- [6] 李绍霄, 李邦亮. 连翘苷经 miR-545-3p/SLC7A11 途径诱导鼻咽癌细胞铁死亡[J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(9):1179-1186.
- [7] Chahardehi AM, Arefnezhad R, Pourbafrani A, et al. MicroRNAs modulation by curcumin, catalpol, and other natural products in Alzheimer's disease: a review[J]. *Mol Biol Rep*, 2025, 52(1):445.
- [8] He W, Zhou X, Mao Y, et al. CircCRIM1 promotes nasopharyngeal carcinoma progression via the miR-34c-5p/FOSL1 axis[J]. *Eur J Med Res*, 2022, 27(1):59.
- [9] 陈瑞, 覃李花, 李杰恩. 鼻咽癌放疗后鼻咽颅底坏死与肿瘤复发鉴别的研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2024, 30(4):63-69.
- [10] 施姮, 舒芳芳. 连翘苷调控细胞因子信号转导抑制因子 1 对肺炎链球菌诱导的肺泡上皮细胞凋亡和氧化应激的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(8):1142-1146.
- [11] Yang C, Bao L, Shi Z, et al. Phillyrin alleviates high glucose-induced oxidative stress and inflammation in HBZY-1 cells through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2024, 76(7):776-787.
- [12] Tang X, Teng J, Lu K. Phillyrin sensitizes lung cancer cells to ferroptosis through inhibiting FTH1/SLC7A11 axis[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2024, 62(1):8-19.
- [13] Gharbaran R, Sayibou Z, Atamturktur S, et al. Diminazene aceturate-induced cytotoxicity is associated with the deregulation of cell cycle signaling and downregulation of oncogenes Furin, c-MYC, and FOXM1 in human cervical carcinoma Hela cells[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2024, 38(1):e23527.
- [14] Abdel-Rasol MA, El-Beih NM, Yahya SS, et al. The antitumor activity of Ginger against colorectal cancer induced by dimethylhydrazine in rats[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22(8):1601-1610.
- [15] Clarke DM, Kirkham MN, Beck LB, et al. Temporal RAGE overexpression disrupts lung development by modulating apoptotic signaling[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2024, 46(12):14453-14463.
- [16] 孙艳平, 汪兴军, 王娜娜. 延龄草总皂苷调控 miR-1284 对鼻咽癌 6-10B 细胞转移和放射敏感性的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(24):3573-3578.
- [17] Zeng C, Duan S, Zhao L, et al. Hsa-miR-92b-3p targeting FHL2 to enhance radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Biochem Genet*, 2025, 63(1):713-729.
- [18] Jin Y, Wang Z, Liang Y, et al. miRNA223p inhibits cell viability and metastasis of nasopharyngeal carcinoma by targeting FOXP1[J]. *Oncol Lett*, 2024, 29(2):96.
- [19] Huang W, Song W, Jiang Y, et al. c-Myc-induced circ-NOTCH1 promotes aggressive phenotypes of nasopharyngeal carcinoma cells by regulating the miR-34c-5p/c-Myc axis[J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(7):1436-1447.

(收稿日期:2025-06-19)

本文引用格式:宋之瑶, 赵建云, 曹汉海, 等. 连翘苷调控 miR-34c-5p 表达对鼻咽癌细胞 CNE-1、CNE-2 凋亡的影响及作用机制分析[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2026, 32(2):40-46. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202625279

Cite this article as: SONG Zhiyao, ZHAO Jianyun, CAO Hanhai, et al. The effect and mechanism of pillryrin on apoptosis of nasopharyngeal carcinoma CNE-1 and CNE-2 cells by regulating miR-34c-5p[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2026, 32(2):40-46. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202625279