

靶向类药物抗肿瘤作用研究与应用专题

论 著

石胡荽来源的 miR396a-5p 对鼻咽癌细胞增殖及迁移的作用及其机制

王玉辉¹, 来佑青¹, 李光禹², 王雨辰³, 冯寒^{2*}, 朱思翔^{1*}¹首都医科大学附属北京积水潭医院耳鼻咽喉科, 北京 100035; ²中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; ³中国医学科学院药物研究所, 北京 100050

[中图分类号] R739.62 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1675.2025.1222

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 王玉辉, 来佑青, 李光禹, 等. 石胡荽来源的 miR396a-5p 对鼻咽癌细胞增殖及迁移的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(4): 500-511.

[收稿日期] 2025-08-14 [录用日期] 2025-10-21 [上线日期] 2025-12-22

[摘要] 目的 检测石胡荽 miRNA 的表达谱, 挖掘高丰度 miRNA 的表达量和二级结构, 探讨石胡荽 miRNA 在鼻咽癌细胞增殖与迁移中的作用。方法 采用 miRNA 高通量测序构建石胡荽 miRNA 表达谱, 使用生物信息学工具比较石胡荽 miRNA 与近亲物种 miRNA 在序列和结构上的差异。采用靶基因预测、转录组测序分析及双荧光素酶报告基因等方法明确 miRNA 的下游靶基因。使用 C666-1 人鼻咽癌细胞系, 采用 CCK-8 法及划痕实验分析石胡荽 miRNA 对细胞增殖及迁移的作用。结果 高通量测序技术解析了石胡荽 miRNA 表达谱, 共鉴定出 243 个 miRNA, 其中 13 个是该植物独有的全新 miRNA, 同时预测获得 miRNA 前体的二级结构。由于石胡荽表达丰度最高的 miR396a-5p 具有独特的成熟体与前体序列和结构, 因而将 miR396a-5p 命名为 cmi-miR396a-5p, 后者在癌症相关途径中可预测到丰富的同源靶基因, 显示出显著的对肿瘤的调控潜力。双荧光素酶报告基因结果显示, cmi-miR396a-5p 直接作用于鼻咽癌进展相关基因 STAT3 的 3'非翻译区(3'UTR), 并抑制 STAT3 mRNA 及蛋白的表达。cmi-miR396a-5p 可下调 STAT3 下游细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白(Bcl-2), 促进细胞凋亡, 明显抑制 C666-1 鼻咽癌细胞的体外增殖和迁移能力($P < 0.05$)。结论 本研究揭示了石胡荽 miRNA 表达谱, 其中石胡荽来源的 cmi-miR396a-5p 可通过靶向负调控 STAT3 发挥显著的抗鼻咽癌活性。

[关键词] 石胡荽; 鼻咽癌; miRNA 跨界调控; miR396a-5pEffect and mechanism of *Centipeda minima*-derived miR396a-5p on the proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cellsWang Yu-Hui¹, Lai You-Qing¹, Li Guang-Yu², Wang Yu-Chen³, Feng Han^{2*}, Zhu Si-Xiang^{1*}¹Department of Otolaryngology, Beijing Jishuitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100035, China²Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China³Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

*Corresponding author. Zhu Si-Xiang, E-mail: zhusixiang@jst-hosp.com.cn; Feng Han, E-mail: jcyx90805118@163.com

This work was supported by the China Postdoctoral Science Foundation (2021M693328)

[Abstract] **Objective** To detect the expression profile of *Centipeda minima* miRNA, explore the expression levels and secondary structures of high-abundance miRNAs, and investigate their role in the proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells. **Methods** The miRNA expression profile of *Centipeda minima* was constructed by miRNA high-throughput sequencing. Bioinformatics tools were used to compare the sequence and structural differences between miRNA from *Centipeda minima* and those from closely related species. The downstream target genes of miRNA were identified using target gene prediction, transcriptome sequencing analysis and dual-luciferase reporter gene assays. The C666-1 human nasopharyngeal carcinoma cell line

[基金项目] 中国博士后科学基金(2021M693328)

[作者简介] 王玉辉, 医学博士, 主要从事鼻炎与鼻咽癌方面的研究

[通信作者] 朱思翔, E-mail: zhusixiang@jst-hosp.com.cn; 冯寒, E-mail: jcyx90805118@163.com

was used to analyze the effects of *Centipeda minima* miRNA on cell proliferation and migration by means of cell viability and scratch assays. **Results** The miRNA expression profile of *Centipeda minima* was analyzed by high-throughput sequencing technology. A total of 243 miRNAs were identified, among which 13 were novel miRNA unique to this plant, and the secondary structures of miRNA precursors were predicted. Since miR396a-5p, which is expressed in the highest abundance in *Centipeda minima*, has unique mature and precursor sequences and structures, we named it cmi-miR396a-5p. cmi-miR396a-5p was predicted to target abundant homologous target genes in cancer-related pathways, indicating significant anti-tumor regulatory potential. The dual-luciferase reporter gene results showed that cmi-miR396a-5p directly acted on the 3' untranslated region (3'UTR) of STAT3, a gene related to the progression of nasopharyngeal carcinoma, and inhibited the mRNA and protein expression of STAT3. cmi-miR396a-5p could down-regulate Cyclin D1 and B-cell lymphoma/leukemia-2 protein (Bcl-2), downstream targets of STAT3, promote cell apoptosis, and significantly inhibit the *in vitro* proliferation and migration ability of C666-1 nasopharyngeal carcinoma cells. **Conclusion** This study revealed the miRNA expression profile of *Centipeda minima*. Among them, cmi-miR396a-5p derived from *Centipeda minima* can exert significant anti-nasopharyngeal carcinoma activity by targeting and negatively regulating STAT3.

[Key words] *Centipeda minima*; Nasopharyngeal carcinoma; miRNA cross-kingdom regulation; miR396a-5p

植物miRNA跨界调控指植物miRNA能够被其他物种的生物个体(如昆虫、动物、病原真菌,甚至人类)摄入并吸收,并进一步调控该物种生物体的基因表达与生理病理过程。植物miRNA跨界调控是一个全新的研究领域,植物来源的miRNA在恶劣的烹饪条件(如蒸煮和煮沸)下可保持稳定,且可有效抵抗唾液的消化作用^[1]。值得注意的是,植物miRNA在高温及pH为1.2的胃蛋白酶中均可存活至少75 min^[2-3]。因此,这些植物来源的miRNA表现出相对较长的半衰期并维持其生物效应^[1,4]。充足的证据表明,植物miRNA的跨界调控是一个天然存在的自然现象。例如,游离的植物miRNA主要通过胃部系统性RNA干扰缺陷蛋白1(SIDT1)的pH值依赖性摄取^[5];水稻miR168a-5p与人类低密度脂蛋白受体衔接蛋白1(LDLRAP1)的mRNA结合后,可抑制LDLRAP1在肝脏中的表达,从而调节肝功能^[4];金银花miR2911与甲型流感病毒的靶基因相互作用并可抑制靶基因的复制和表达^[6]。以上发现表明,植物miRNA可特异性靶向和沉默哺乳动物和病毒中的基因,且中草药(如金银花)miRNA存在跨界调控的作用。更重要的,包含miRNA的植物类外泌体纳米囊泡可直接被胃肠道吸收而进入细胞^[7];进食的植物miRNA可经由循环进入癌组织,从而发挥抑制乳腺癌细胞增殖和迁移的作用^[8-9]。石胡荽(*Centipeda minima*),又称鹅不食草,是菊科石胡荽属中具有抗癌活性分子的一年生草本药用植物^[10-12],其特有的miRNA表达谱尚未见报道,石胡荽miRNA是否能成为抗鼻咽癌的关键分子仍有待探讨。因此,本研究采用miRNA测序、靶基因预测、双荧光素酶报告基因等实验方法来挖掘石胡荽的miRNA表达谱,并探讨该植物中miRNA的抗鼻咽癌作用及相关机制,旨在为探讨石胡荽miRNA在鼻咽癌发生发展中的作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器 石胡荽样本采自中国广东省佛山市。兔抗信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)抗体(AF1492)购自上海碧云天生物技术有限公司, B细胞淋巴瘤-2基因(Bcl-2)抗体(60178-1-Ig)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)抗体(26939-1-AP)和辣根过氧化物酶(HRP)标记的聚合物偶联山羊抗兔IgG(SA00001-2)购自武汉三鹰生物技术有限公司,小鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(66009-1-Ig)购自柏奥易杰(北京)科技有限公司,人鼻咽癌细胞C666-1(BNCC337872)、HONE-1(BNCC338405)及HEK293T(BNCC353535)购自河南信阳北纳创联生物科技有限公司,大鼠鼻咽癌细胞系(FAT, YS1677C)购自上海雅吉生物科技有限公司,细胞核染料(hoechst 33342, R37165)与细胞膜染料(CellMask™细胞膜染色剂, C10046)购自美国赛默飞世尔科技公司。细胞凋亡检测试剂盒(40302ES60)购自上海翌圣生物科技股份有限公司。pGL-basic、pRL-TK质粒以及超增强细胞计数试剂盒-8(CCK-8)和双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Lipofectamine 2000、Lipofectamine 3000、Trizol试剂、DMEM及NanoDrop分光光度计购自美国赛默飞世尔科技公司。人工合成的cmi-miR396a-5p模拟物(5'-UUCCACGGCUUUCUUGAACUG-3')、miRNA对照(5'-AUCGAUCGAUCGAUCGAUCGA-3')、miRNA抑制剂(5'-CAGUUCAAGAAAGCCGUGGAA-3')和Cy3标记的miRNA(用于miRNA示踪)购自上海捷瑞生物工程有限公司。Agilent 2100生物分析仪购自美国安捷伦科技有限公司。NextSeq 500系统、NEBNext Ultra RNA文库制备试剂盒购自美国新英格兰生物公司。CKX53倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司,流式细胞仪(FACSAria IIIu)购自美国BD公司,激光共聚焦显微镜(Zeiss LSM980)购自

德国卡尔蔡司有限公司。STAT3-WT 及 STAT3-MUTANT(G5142261-5, G5142261-6)构建于上海迪赢生物科技有限公司。

1.2 总 RNA 提取、miRNA 文库准备和测序 使用 Trizol 试剂提取石胡荽中的总 RNA, 随后用 DNase I 处理以去除污染的基因组 DNA。通过变性琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 的完整性, 采用 NanoDrop 分光光度计定量检测 RNA 的浓度。所有 RNA 样本的浓度为 200 ng/ μ l, 总产量为 2 μ g。使用 QIASeq miRNA 文库试剂盒从总 RNA 构建 miRNA 测序文库。将预腺苷酸化的 DNA 接头连接到 miRNA 的 3' 末端, 然后将 RNA 接头连接到 5' 末端。通过在扩增过程中进行样本特异性索引创建索引文库, 随后进行文库清理。文库在 NextSeq 500 系统上进行测序。

1.3 石胡荽中保守和新型的 miRNA 检测 通过 Blastn(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、Rfam 9.1(<http://rfam.xfam.org>)和 miRBase 15.0(<http://www.mirbase.org>)基因功能预测网站以默认参数鉴定石胡荽中的保守 miRNA。将 miRNA 候选者与石胡荽的基因组序列比对以定义潜在的新型 miRNA, 参考基因组来自国家生物信息中心(<https://ngdc.cncb.ac.cn/gwh/Assembly/18046/show>)。

1.4 miRNA 的靶基因和二级结构预测 使用 Miranda(<http://www.microrna.org>)和 Targetscan(<https://www.targetscan.org>)网站预测 miRNA 候选基因的靶基因。使用 mfold(<http://www.mfold.org>)网站预测 miRNA 的二级结构, 成熟 miRNA 序列以蓝色突出显示。

1.5 鉴定靶基因的功能富集和通路分析 通过 BlastX(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)对蛋白质数据库进行相似性搜索, 对此前预测的靶基因进行注释。通过 DAVID 在线分析工具(<https://davidbioinformatics.nih.gov>)进行功能聚类分析。使用由 omicstudio(<https://www.omicstudio.cn>)提供的京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)分析来识别生物通路及相关的人类基因。

1.6 细胞转染 如前所述构建过表达 cmi-miR396a-5p 的质粒^[4], 转染空载质粒和 cmi-miR396a-5p 表达质粒(过表达组)的细胞互为对照, 转染 STAT3-WT 与 STAT3-MUTANT 质粒的细胞互为对照。转染 miRNA 对照(对照组)与 cmi-miR396a-5p 模拟物(实验组)的细胞互为对照, 观察 STAT3 表达、3'UTR 结合及后续的细胞增殖、迁移情况。以 cmi-miR396a-5p 模拟物(对照组)及模拟物+miRNA 抑制剂(实验组)转染细胞, 检测 STAT3 的 mRNA 和蛋白表达水平。Cy3 标

记的 miRNA 用于在细胞内示踪 miRNA 的水平和定位, 使用未连接 miRNA 的 Cy3 作为阴性对照。C666-1 和 HONE-1 细胞接种至 24 孔板中, cmi-miR396a-5p 模拟物等使用 Lipofectamine 3000 进行瞬时转染。转染 48 h 后, 转染细胞被选择用于后续转录组、报告基因、细胞活性及划痕实验等操作, 实验重复 3~4 次。

1.7 转录组分析 按照说明书使用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA。使用 Agilent 2100 生物分析仪评估 RNA 的完整性, 仅 RNA 完整性数值(RNA integrity number, RIN 值)>7.0 的样本可用于文库构建。使用 NEBNext Ultra RNA 文库制备试剂盒, 按照 Illumina 制造商的协议准备 RNA-seq 文库。在 Illumina HiSeq 平台上由苏州金唯智生物科技有限公司使用配对末端 2x150 bp 配置进行测序分析 STAT3 和叉头框蛋白 O3 (forkhead box O3, FOXO3)等 mRNA 的表达水平。

1.8 双荧光素酶报告实验 使用双荧光素酶检测试剂盒按照说明书进行双荧光素酶报告实验。将预测的 3'非翻译区(3'UTR)或相应的突变序列克隆到编码萤火虫荧光素酶报告基因的 pGL-basic 载体中。将 HEK293T 细胞接种于 24 孔板, 使用 Lipofectamine 2000 将野生型或突变型序列同源重组后的 pGL-basic 质粒分别转染细胞, 并以 pRL-TK 质粒作为内参照共转染细胞。转染后 24 h 收集细胞进行萤火虫荧光素酶活性分析, 将海肾荧光作为对照进行标准化。

1.9 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 STAT3 mRNA 的表达 采用 Trizol 法提取总 RNA, 去除残留基因组 DNA 后将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应条件与引物参考文献[13], 结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示。

1.10 Western blotting 检测 STAT3 及下游蛋白的表达 将细胞按照分组进行转染, 提取总蛋白后进行电泳、转膜、封闭, 在 4℃ 冰箱过夜孵育 STAT3 (1:2000)、Cyclin D1(1:2000)及 Bcl-2(1:2000)抗体。TBST 洗膜, 加入山羊抗小鼠(1:5000)或山羊抗兔二抗(1:5000)室温孵育 2 h; TBST 再次洗膜, 加入 ECL Plus 超敏发光液作为可视化信号进行曝光, 检测 cmi-miR396a-5p 对靶蛋白 STAT3、Cyclin D1 及 Bcl-2 表达的影响。

1.11 CCK-8 法检测细胞的增殖能力 转染不同浓度(0、0.5、1、2、4、8 μ mol/L)的 cmi-miR396a-5p 表达质粒和人工合成的 cmi-miR396a-5p 模拟物, 采用 CCK-8 法检测 C666-1 细胞的活性。按说明书将 CCK-8 溶液加入 C666-1 细胞并孵育 2 h, 采用微孔板读数器在 450 nm 处测量吸光度(OD)值, 并通过比较实验组与对照组的 OD 值来计算细胞活性。

1.12 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 将 C666-1 细胞在 6 孔板中使用 DMEM 培养液进行培养至 90%

的细胞融合度。使用200 μl 移液器尖端在单层细胞中引入划痕，PBS洗涤5 min 去除漂浮细胞，然后在无血清培养基中培养细胞72 h。采用奥林巴斯CKX53倒置显微镜在0、24、48、72 h 拍摄划痕的图像，并使用ImageJ 软件分析细胞的迁移区域。

1.13 miRNA示踪及细胞凋亡检测 使用Cy3 标记的miRNA 孵育C666-1 及HONE-1 细胞12 h，使用Hochest 与细胞膜染料共同孵育以定位细胞膜与细胞核。采用激光共聚焦显微镜观察miRNA 进入细胞的情况。使用miRNA 对照与cmi-miR396a-5p 模拟物孵育C666-1 及HONE-1 细胞48 h后，按照细胞凋亡检测试剂盒说明书步骤处理细胞，并采用流式细胞仪进行定量检测。

1.14 统计学处理 采用GraphPad Prism 9.5 软件进行统计分析。所有数据均为计量资料，采用Kolmogorov-Smirnov 检验进行正态性检验，均呈正态分布，以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较采用Student's *t* 检验；多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用Turkey 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 石胡荽中保守的和全新的miRNA 石胡荽具有独特的形态特征(图1A)：茎多枝，微被蛛丝状毛；叶子互生，楔状倒披针形，叶背面也被蛛丝状毛；花朵为圆润黄绿色，形状扁球形，其头状花序，总苞半球形，苞片绿色椭圆状披针形；花朵外侧有多层花为雌性，花冠细管状，淡黄或绿色。为探索石胡荽潜在的活性miRNA，首先通过高通量测序检测miRNA 序列的表达谱。在对net reads 的分析(图1B)中，获得了来自石胡荽的高质量miRNA 序列，其具备高水平的完整性，未见明显的降解(RIN 值>7)。

通过高通量测序共鉴定出243 个miRNA，其中13 个miRNA 是在石胡荽中鉴定出的全新miRNA(图1C)，230 个为保守miRNA。这证实本研究选择了合适的参考基因组，并获得了石胡荽特异性的miRNA 表达谱。此外，230 个保守的miRNA 与数据库已报道的多个物种的miRNA 序列具有同源相似性，其中洋蓟(56 种，25%) 同源性最高，其次是大豆(37 种，16.44%)、菊芋(34 种，15.11%) 等。230 个保守的miRNA 按照丰度排序，前5 位依次为：mtr-miR166a (204 712 个 reads)、cca-miR396a-5p_2ss7AG21TG (124 165 个 reads)、htu-miR159a(82 217 个 reads)、cca-miR396a-5p(60 723 个 reads)、cca-MIR6113-p3_1ss3AG_2(42 623.50 个 reads)；在13 个全新miRNA 中，丰度排名前5 位的是：PC-5p-169_3141(3245 个 reads)、PC-3p-839_633(708 个 reads)、PC-3p-2929_237(501 个 reads)、PC-5p-3828_197(359 个 reads) 和PC-5p-1132_490(319.50 个 reads)，其成熟形态对应的丰度值及其序列如图1D 及表1 所示。鉴于与其他miRNAs 相比，miR396a-5p 在石胡荽中的表达水平明显高于其他miRNA(丰度前5 位的miRNA，miR396a-5p 占了两位)，因此，本研究假设在石胡荽中发挥生物学功能的主要miRNA 为miR396a-5p。

2.2 石胡荽成熟miRNA 和前体的序列和二级结构 石胡荽中高表达两种保守miR396a-5p 的序列及二级结构见图2。与miRBase 数据库中报道的刺苞菜蓟(*Cynara cardunculus*, cca)-miR396a-5p 参考序列相比，石胡荽表达的cca-miR396a-5p_2ss7AG21TG 的种子序列的第7 位核苷酸是G，而不是A，3'端最后一位核苷酸是G 而不是U，将这种石胡荽的miRNA 的成熟体序列标记为cmi-miR396a-5p_1，将另外一种与cca-miR396a-5p 序列完全一致的成熟体标记为cmi-

表1 高丰度的前5 个保守miRNA 及前5 个新型miRNA 序列(由高到低展示)

miRNA 名称	长度(nt)	miRNA 序列(5'-3')
保守 miRNA		
mtr-miR166a	21	UCGGACCAGGCUUCAUUC
cca-miR396a-5p_2ss7AG21TG	21	UCCACGGCUUCUUGAACUG
htu-miR159a	21	UUUGGAUUGAAGGAGCUCUA
cca-miR396a-5p	21	UCCACAGCUUCUUGAACUU
cca-miR6113-p3_1ss3AG_2	22	UCGCCUCUGAAACUCAAGAACA
新型 miRNA		
PC-5p-169_3141	22	UCGGGCAGCACCAUGCAUAUC
PC-3p-839_633	24	CUAGGUCAUGCGGACAGCUUCACU
PC-3p-2929_237	21	CAACACUGCACUCGAUUAUGU
PC-5p-3828_197	22	UCAUCGCCUCUGAAACUCAAGA
PC-5p-1132_490	22	CAUCUCUCCCUCAAAGACUUCU

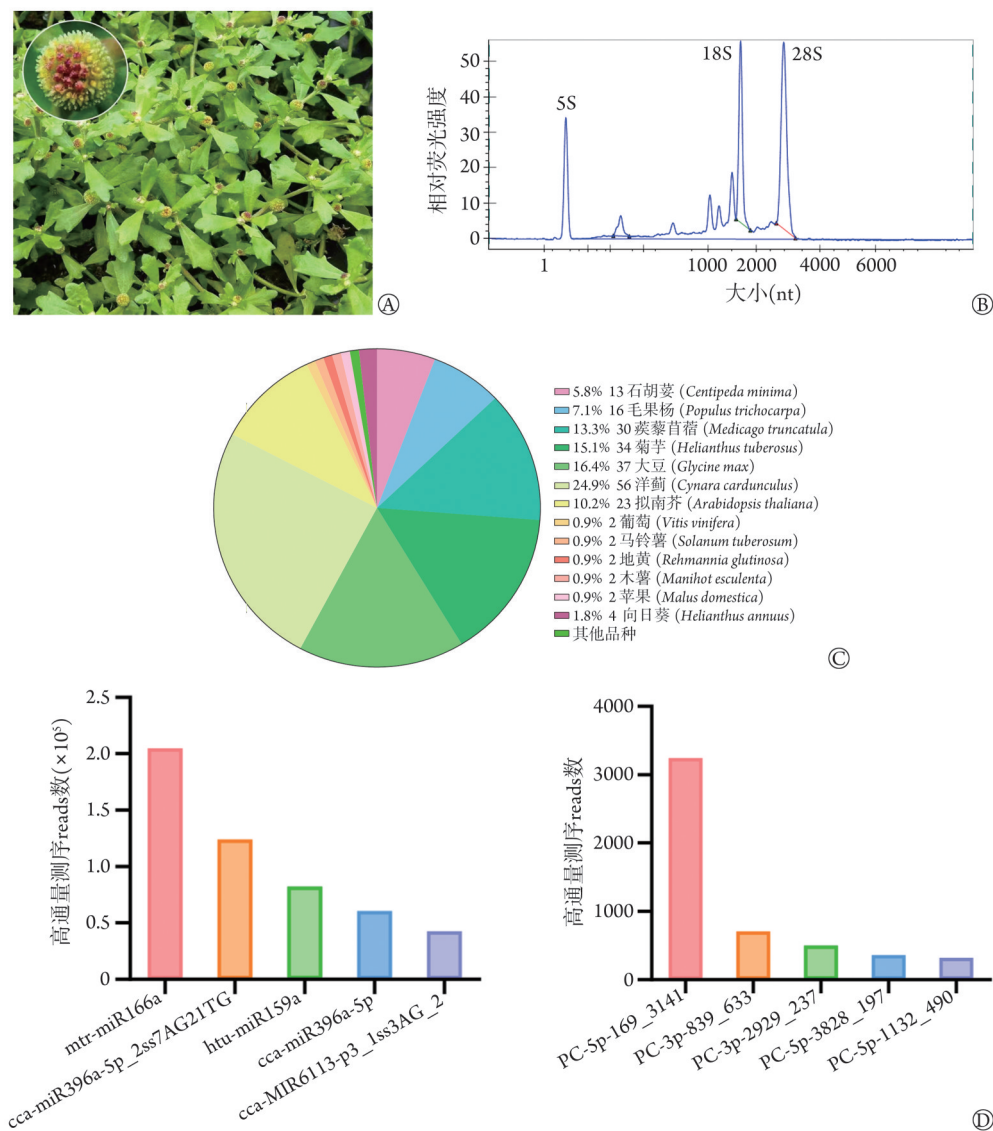


图1 石胡荽保守的及全新的miRNA序列的鉴定与表征

Fig.1 Identification and characterization of conserved and novel miRNA sequences in *Centipeda minima*

A. 新鲜的石胡荽实景图(后续从该样本中提取miRNA); B. 生物分析仪对RNA样本进行质量控制检测(RIN值>7); C. 石胡荽中miRNA的保守性、种类和相对丰度饼状图; D. 高丰度的前5个保守miRNA和前5个新型miRNA的读取计数(由高到低展示)

miR396a-5p₂(图2A)。与 cca-miR396a-5p 比较, cmi-miR396a-5p₁ 和 cmi-miR396a-5p₂ 序列长度为21个核苷酸, 且具有相似的种子序列(图2A)。此外, cmi-miR396a-5p₁ 的前体序列对应两种不同的转录本, 将 cmi-miR396a-5p₁ 对应的两个转录本前体序列标记为 cmi-MIR396a₁、cmi-MIR396a₂; cmi-miR396a-5p₂ 对应的前体序列标记为 cmi-MIR396a₃。cca-miR396a 的前体序列长度为119个核苷酸, cmi-miR396a 的3种不同前体的序列长度分别为133、167和133个核苷酸(图2B)。使用 mfold 预测的3种前体序列的二级结构见图2C。尽管石胡荽中miR396a的前体(30.0%~42.0%)和成熟形式(90.5%)与 miRBase 中的 cca-miR396a 具有一定的相似性, 但由于特定核苷酸位置的差异, 可能导致其二级结构和切割位点不

同, 最终导致石胡荽中 cmi-miR396a 的前体序列具有独特的发夹结构和茎环构型, MIR396a 前体的3种不同二级结构如图2C所示。

2.3 石胡荽 miR396a-5p 对 STAT3 的跨界沉默作用
为阐明石胡荽 miRNA 在跨界调控中的潜在作用, 本研究对石胡荽中最丰富的 miRNA, 特别是表达量最高的 cmi-miR396a-5p (cmi-miR396a-5p₁) 进行重点研究, 并采用同源靶基因预测方法鉴定其在多个物种中的潜在同源靶基因。KEGG 富集结果显示与 cmi-miR396a-5p 相关的重要途径(图3A)。这些途径根据富集分数进行排名, 其中最重要的通路为“癌症通路”。大鼠鼻咽癌细胞系(FAT)与人鼻咽癌细胞系(C666-1)的转录组分析结果显示, 与相应的对照组相比, cmi-miR396a-5p 过表达组的 STAT3、MET 和



A. 洋蓟 (*Cynara scolymus*, cca) miR396a-5p 与 石胡荽 (*Centipeda minima*, cmi) miR396a-5p_1 和 cmi-miR396a-5p_2 序列比对; B. cmi-MIR396a_1、cmi-MIR396a_2、cmi-MIR396a_3 与 cca-miR396a-5p 前体的序列比对 (一致的 miRNA 序列以红色显示, 不同的序列以蓝色显示); C. mfold 预测的 cmi-MIR396a_1、cmi-MIR396a_2 及 cmi-MIR396a_3 的推定二级结构 (这些结构用表示碱基配对的彩色圆点表示, 其中蓝色表示成熟体, 黑色表示前体)

为进一步明确 cmi-miR396a-5p 对 STAT3 的调控作用, qRT-PCR 与 Western blotting 检测结果显示, 与 miRNA 对照比较, 孵育的 cmi-miR396a-5p (终浓度 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$) 可明显降低 C666-1 细胞中 STAT3 mRNA 和蛋白表达水平 ($P<0.05$); 与 cmi-miR396a-5p 比较, 在

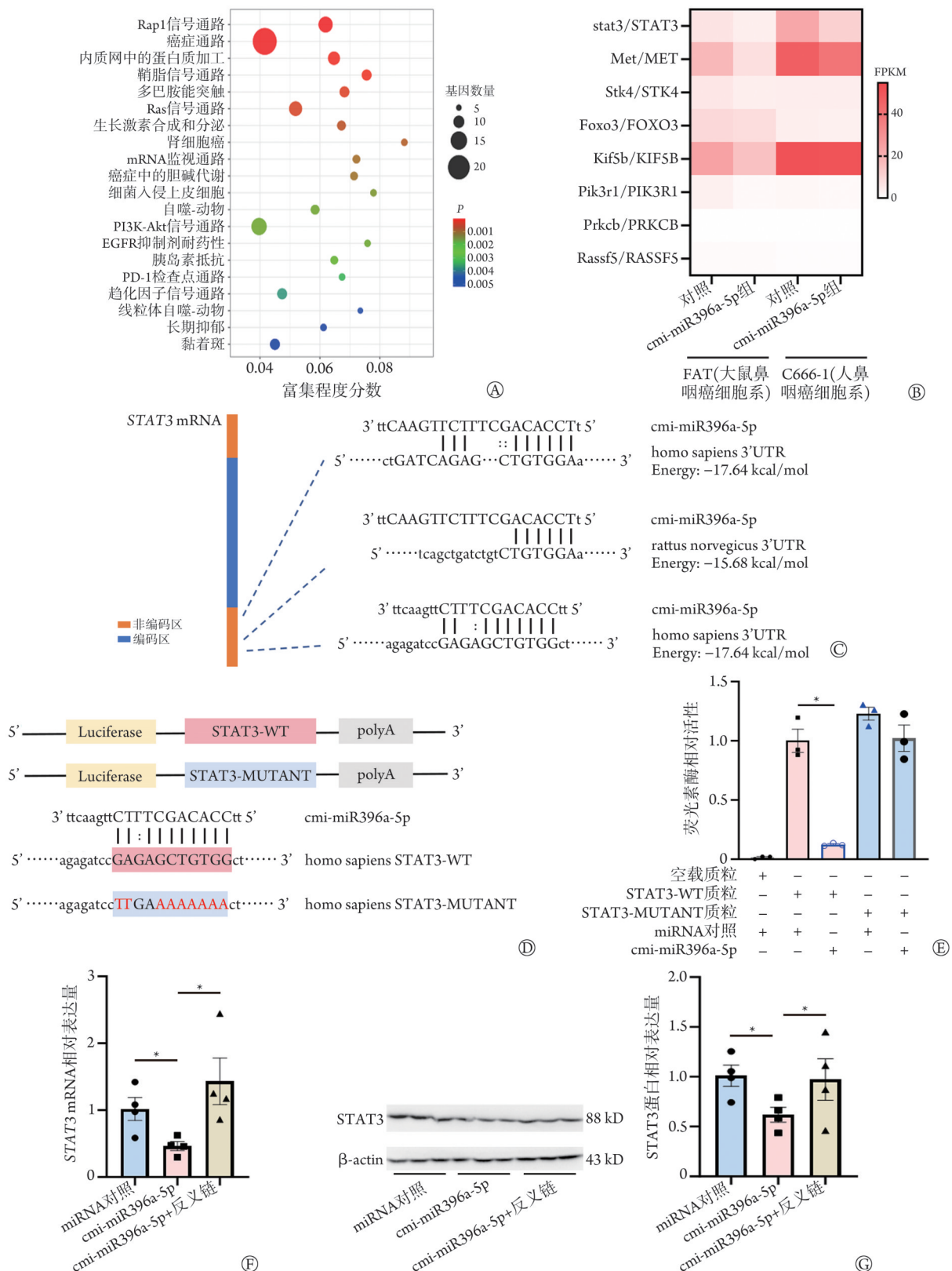


图3 cmi-miR396a-5p的通路富集分析及对同源靶基因STAT3的调控

Fig.3 Enrichment analysis of pathways of cmi-miR396a-5p and its regulation of homologous target gene STAT3

A. cmi-miR396a-5p的靶基因预测, 靶向癌症通路的京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析; B. 转录组测序分析与表达差异基因, 大鼠与人鼻咽癌细胞系中 cmi-miR396a-5p 过表达组与对照组所选基因的表达差异(小写基因名称代表大鼠基因, 大写代表人的基因); C. cmi-miR396a-5p 在人、大鼠和小鼠STAT3 mRNA 3'非翻译区(3'UTR)上的结合位点示意图; D. cmi-miR396a-5p 双荧光素酶报告基因构建及结合位点预测示意图。荧光素酶报告基因构建与STAT3基因3'UTR序列的野生型(STAT3-WT)或突变型(STAT3-MUTANT)的序列设计; E. STAT3双荧光素酶活性的测定($n=3$); F. qRT-PCR检测STAT3 mRNA表达水平($n=4$); G. Western blotting检测STAT3蛋白表达水平($n=4$)。* $P<0.05$

cmi-miR396a-5p的基础上添加miRNA抑制剂(反义链)可明显上调 *STAT3* mRNA 和蛋白表达水平($P<0.05$) (图 3F、G)。

2.4 cmi-miR396a-5p 对人鼻咽癌细胞增殖和迁移的影响 CCK-8法检测结果显示,随着 cmi-miR396a-5p 质粒浓度的增加,C666-1 细胞活力呈剂量依赖性下降,与对照(0 $\mu\text{g/ml}$)相比,2、4、8 $\mu\text{g/ml}$ 均可明显

下调细胞活性,其中 4 $\mu\text{g/ml}$ 导致的下降最明显($P<0.01$)(图 4A)。转染 cmi-miR396a-5p 模拟物也显示出细胞活力呈剂量依赖性降低,与对照(0 $\mu\text{g/ml}$)相比,4 $\mu\text{mol/L}$ 导致的降低最明显($P<0.05$)(图 4A)。

进一步研究 cmi-miR396a-5p 对鼻咽癌细胞迁移能力的影响,结果显示,cmi-miR396a-5p 质粒($P<0.05$) 和 cmi-miR396a-5p 模拟物($P<0.05$)明显抑制 C666-1 细

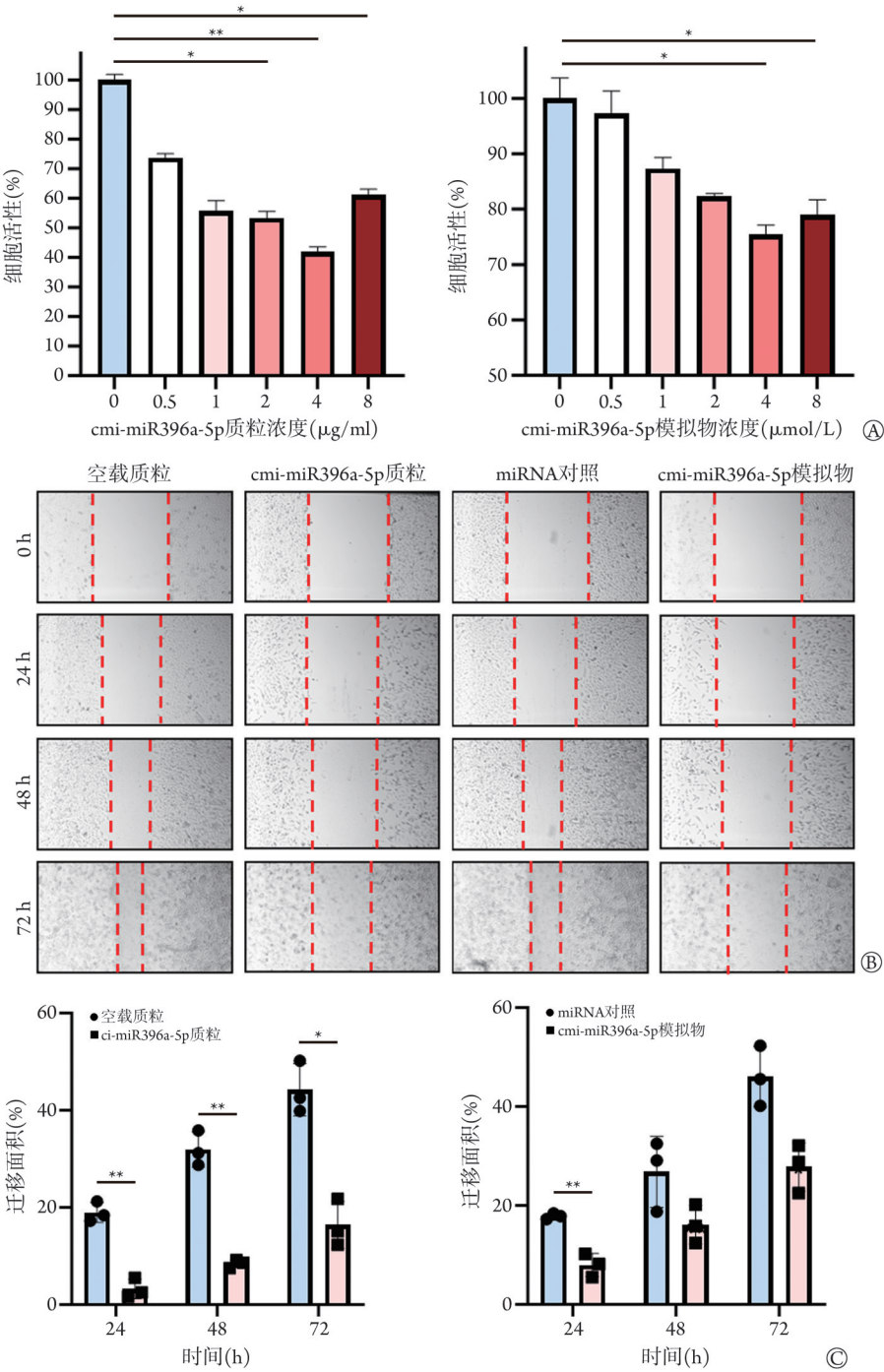


图 4 cmi-miR396a-5p 对 C666-1 鼻咽癌细胞增殖和迁移的作用

Fig.4 Effect of cmi-miR396a-5p on the proliferation and migration of C666-1 nasopharyngeal carcinoma cells

A. 过表达 cmi-miR396a-5p 质粒或 cmi-miR396a-5p 模拟物对 C666-1 人鼻咽癌细胞活性的影响($n=4$); B. 在过表达 cmi-miR396a-5p 质粒或 cmi-miR396a-5p 模拟物处理 C666-1 细胞后,在 0、24、48 和 72 h 使用划痕实验检测细胞迁移能力($\times 100$); C. 细胞划痕实验后的 0、24、48、72 h, cmi-miR396a-5p 质粒或 cmi-miR396a-5p 模拟物处理对 C666-1 细胞迁移面积的定量分析($n=3$).* $P<0.05$, ** $P<0.01$

胞迁移(图4B—C)。

2.5 cmi-miR396a-5p的跨膜运输及促细胞凋亡作用
使用100 nmol/L Cy3标记的 cmi-miR396a-5p 孵育 C666-1 与 HONE-1 细胞 12 h 后, 使用 Hoechst 与 Cellmask 细胞膜染料定位细胞核(蓝色)与细胞膜(白色)。在未添加任何转染试剂的情况下, cmi-miR396a-5p 可直接进入细胞, 并定位于细胞质, 提示 cmi-miR396a-5p 可自主跨膜运输并进入细胞发挥作用(图5A)。Western blotting 检测结果显示, cmi-miR396a-5p 可下调 Cyclin D1 和 Bcl-2 蛋白的表达($P<0.01$, 图5B)。另外, 流式细胞术检测结果显示, cmi-miR396a-5p 可明显增加 C666-1 与 HONE-1 的细胞凋亡率($P<0.01$, 图5C)。

3 讨 论

石胡荽是耳鼻喉疾病常用的一种传统中草药, 主要作用是抗炎和抗肿瘤, 包括抑制慢性鼻炎、鼻窦炎, 以及通过靶向细胞凋亡与自噬来抑制鼻咽癌^[13-15]。其抗癌的基本活性成分包括 Brevilin A 和 Arnicolide C/D。该药物的乙醇提取物及单体化合物(如 Brevilin A、Arnicolide C/D)可阻滞鼻咽癌细胞(CNE-1)周期于 G₂/M 期, 并通过线粒体途径诱导癌细胞凋亡^[16-17]。然而, 目前受限于小分子化合物半衰期短的缺点, 该药物发挥的作用有限, 鉴于石胡荽含有的活性成分多样, 后续研究应着力于深度挖掘全新的活性成分来解析其全新的药用价值。比如, Wei 等^[11]以石胡荽作为对象, 鉴定出 12 种全新的活性化合物, 并验证其构效关系。本研究鉴定出石胡荽中有 230 个现有数据库中提及的 miRNA 表达, 以及 13 个全新的 miRNA; 同时比较高丰度 cmi-miR396a-5p 在石胡荽基因组与成熟体序列的差异发现, 石胡荽所表达的 cmi-miR396a-5p 具有 3 个不同的转录本, 且前体序列与其他物种不同, 具有独特的基因组信息。因此, 本研究通过高通量测序解析石胡荽独特表达的 miRNA, 并展示了其对应的基因组信息和 miRNA 前体的二级结构。

越来越多的证据表明, 植物来源的 miRNA 可通过跨界调控的方式参与哺乳动物的代谢、免疫、癌症及病毒的复制^[4,6,8,18-20]。植物 miRNA 的抗癌研究目前仍处于起步阶段, 其中检测到人类血清中的植物 miR159 与乳腺癌呈负相关, 可能的机制为 miR159 靶向转录因子 7(TCF7)从而抑制乳腺癌细胞增殖^[8]; miR159 还可降低 TCF7 的转录活性及其下游髓细胞瘤癌基因(MYC)蛋白水平, 而且其作用仅针对乳腺癌细胞(如 MDA-MB-231), 不影响正常细胞(如 MCF-10A)^[8]。最新的研究显示, 花椰菜 miR156a 模拟物通过靶向 JAMA 的 3'UTR 抑制 p-Akt 信号通路发

挥抑制鼻咽癌细胞上皮-间质转化(EMT)的作用^[14]。以上研究结果提示, 植物 miRNA 可通过进食被递送至哺乳动物癌细胞内, 使具有生物学活性的 miRNA 靶向降解相应的靶基因发挥抗癌疗效。然而, 石胡荽作为传统的临床药物, 既往对于其是否存在可发挥抑制鼻咽癌作用的 miRNA 尚不清楚。

本研究发现, cmi-miR396a-5p 是石胡荽表达丰度最高的 miRNA, 对 cmi-miR396a-5p 进行了同源靶基因分析, 并发现富集度最高的通路为癌症通路, 提示 cmi-miR396a-5p 在调节与癌症发生和进展有关的各种生物过程中具有潜在作用, 可影响癌症相关途径, 并可能通过跨界调节在癌症中作为潜在的治疗靶点或生物标志物, 与先前的研究结果^[8,14]一致。本研究通过靶基因预测与转录组测序发现, 过表达 cmi-miR396a-5p 的大鼠与人的鼻咽癌细胞系中 STAT3 基因的表达水平均被明显抑制; 同时, cmi-miR396a-5p 存在与大鼠、小鼠和人 STAT3 基因 3'UTR 的结合位点; 双荧光素酶报告基因的结果也确认 cmi-miR396a-5p 可与 STAT3 基因的 3'UTR 区直接结合来发挥基因沉默的作用。

STAT3 作为鼻咽癌的核心致癌因子, 通过调控增殖、凋亡、侵袭、血管生成及治疗抵抗驱动肿瘤进展。STAT3 活化后与 Cyclin D1 启动子结合, 可驱动细胞周期进展, 导致癌细胞无限增殖^[21]。沉默 STAT3 基因或上游调控因子(如突触结合蛋白-7、醛脱氢酶 1 家族成员 A3)可抑制 STAT3 活化, 阻断肿瘤生长和糖酵解代谢^[22-23]。研究显示, 小分子化合物 Stattic 可抑制 STAT3 磷酸化, 降低 Cyclin D1 表达, 诱导鼻咽癌细胞凋亡, 并增强其对顺铂和放疗的敏感性^[21]。在明确 STAT3 是 cmi-miR396a-5p 下游直接作用的靶分子后, 本研究进一步使用 cmi-miR396a-5p 质粒和 cmi-miR396a-5p 模拟物分别转染 C666-1 细胞, 结果均发现 cmi-miR396a-5p 在下调 STAT3 表达的同时, 还可抑制鼻咽癌细胞的增殖与迁移。此外, cmi-miR396a-5p 可下调 C666-1 细胞中 Cyclin D1 与 Bcl-2 的表达, 并诱导多种人鼻咽癌细胞凋亡, 提示 cmi-miR396a-5p 可能通过下调 Cyclin D1 及 Bcl-2 的表达, 促进癌细胞凋亡, 最终发挥抗肿瘤作用。

STAT3 是广泛被认可的癌性转录因子, 在超过 70% 的实体肿瘤中存在异常活化现象, 其中包括乳腺癌^[24-25]、非小细胞肺癌^[26-27]、结直肠癌^[28-29]、胃癌^[30]、胰腺癌^[31-32]、肝细胞癌^[33]及其他实体肿瘤^[32,34]。高 STAT3/p-STAT3 表达普遍与较差的总体生存或疾病特异性生存相关, 尤其在乳腺癌、结直肠癌、胃癌、肺癌、胰腺癌中^[25,29,35]。STAT3 直接诱导 Bcl-2、BCL-XL、MYC、Cyclin D1 等基因的表达, 可导致细胞增殖、抗凋亡及免疫逃逸。由于其存在

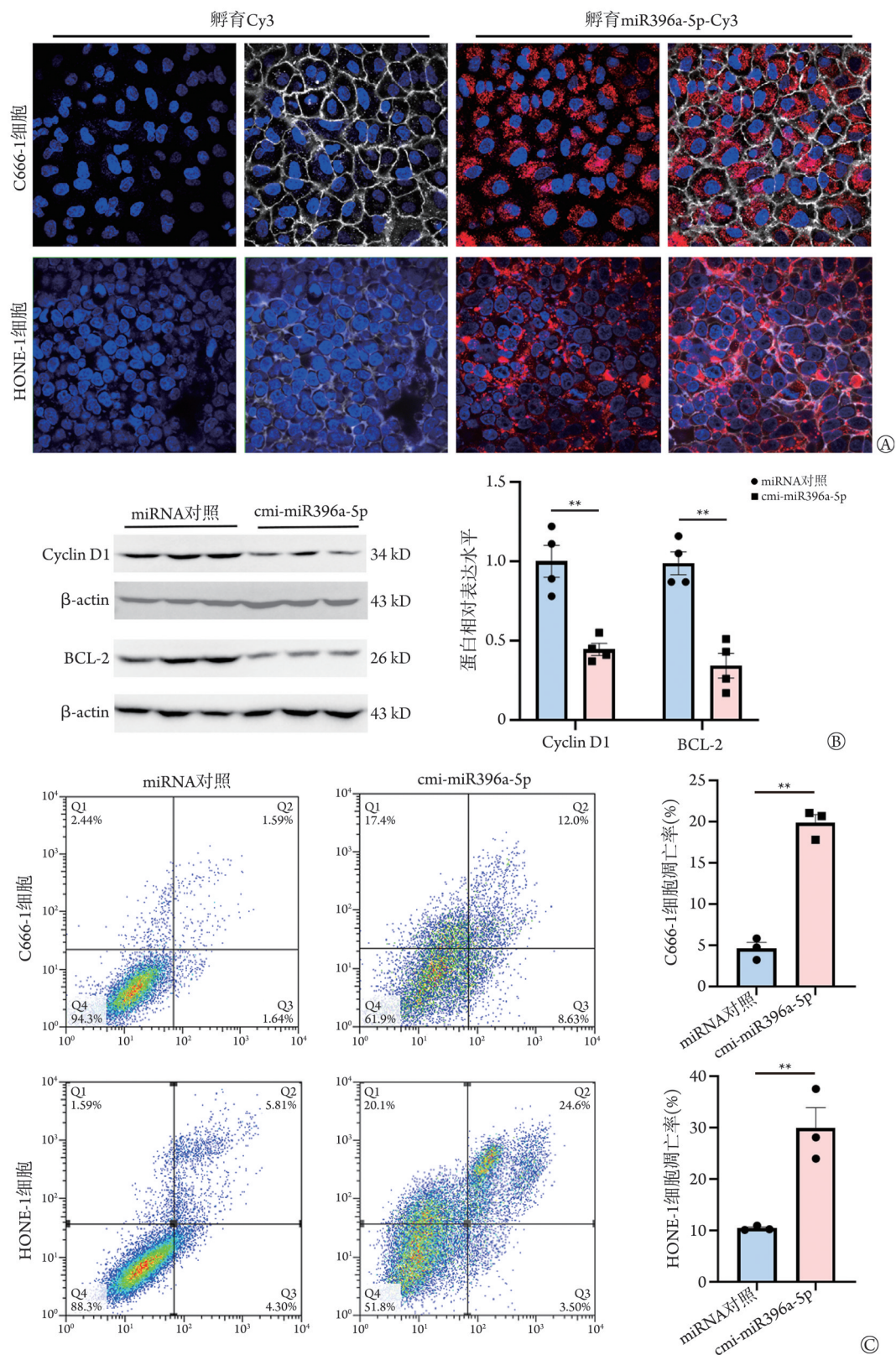


图5 cmi-miR396a-5p的跨膜运输及促细胞凋亡作用

Fig.5 Transmembrane transport and pro-apoptotic effect of cmi-miR396a-5p

A. 激光共聚焦显微镜检测人鼻咽癌细胞对 cmi-miR396a-5p(100 nmol/L)的摄取情况(蓝色示细胞核, 白色示细胞膜, 红色示 Cy3 标记的 cmi-miR396a-5p); B. Western blotting 检测 cmi-miR396a-5p 下游的 Cyclin D1 与 Bcl-2 蛋白表达水平; C. 流式细胞术检测 cmi-miR396a-5p 对人鼻咽癌细胞凋亡的影响($n=3$)。** $P<0.01$

多重促瘤功能, STAT3已成为肿瘤治疗研究中的重要靶点。由于 cmi-miR396a-5p 在多种癌症细胞中均可抑制 STAT3 的表达, 因而有望成为一种广谱的抗癌药物。

综上所述, 本研究通过高通量测序、同源靶基因预测及功能学验证, 从多个维度证实 cmi-miR396a-5p 是石胡荽富集的 miRNA, 且该 miRNA 可进入肿瘤细胞, 靶向 STAT3 而发挥抗鼻咽癌的作用。本研究不仅发现了新型的中草药活性药物分子, 还揭示其 miRNA 的跨界机制, 提出了新的抗癌思路, 为临床治疗和基础研究提供了新的范式。然而, 由于本研究缺乏体内研究的数据支持, cmi-miR396a-5p 的抗癌作用仍有待进一步在哺乳动物体内验证。此外, 类外泌体纳米颗粒作为植物 miRNA 的重要载体, 是否通过递送 cmi-miR396a-5p 而发挥抗癌作用仍有待后续进一步研究。

【参考文献】

- [1] Luo Y, Wang P, Wang X, et al. Detection of dietetically absorbed maize-derived microRNAs in pigs[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 645.
- [2] Philip A, Ferro VA, Tate RJ. Determination of the potential bioavailability of plant microRNAs using a simulated human digestion process[J]. Mol Nutr Food Res, 2015, 59(10): 1962-1972.
- [3] Qin X, Wang X, Xu K, et al. Digestion of plant dietary miRNAs starts in the mouth under the protection of coingested food components and plant-derived exosome-like nanoparticles[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70(14): 4316-4327.
- [4] Zhang L, Hou D, Chen X, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA[J]. Cell Res, 2012, 22(1): 107-126.
- [5] Chen Q, Zhang F, Dong L, et al. SIDT1-dependent absorption in the stomach mediates host uptake of dietary and orally administered microRNAs[J]. Cell Res, 2021, 31(3): 247-258.
- [6] Zhou Z, Li X, Liu J, et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses[J]. Cell Res, 2015, 25(1): 39-49.
- [7] Li D, Yi G, Cao G, et al. Dual-carriers of Tartary buckwheat-derived exosome-like nanovesicles synergistically regulate glucose metabolism in the intestine-liver axis[J]. Small, 2025, 21(16): e2410124.
- [8] Chin AR, Fong MY, Somlo G, et al. Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159[J]. Cell Res, 2016, 26(2): 217-228.
- [9] Liu J, Wang F, Song H, et al. Soybean-derived gma-miR159a alleviates colon tumorigenesis by suppressing TCF7/MYC in mice[J]. J Nutr Biochem, 2021, 92: 108627.
- [10] Zhu P, Zheng Z, Fu X, et al. Arnicolide D exerts anti-melanoma effects and inhibits the NF- κ B pathway[J]. Phytomedicine, 2019, 64: 153065.
- [11] Wei J, Zhao X, Wu B, et al. Centipeda minima extract exhibits anti-liver cancer effects via the ER stress/HMOX1/Fe²⁺/ROS pathway[J]. Phytomedicine, 2025, 139: 156487.
- [12] Hsu CY, Rajabi S, Hamzeloo-Moghadam M, et al. Sesquiterpene lactones as emerging biomolecules to cease cancer by targeting apoptosis[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1371002.
- [13] Tan J, Qiao Z, Meng M, et al. Centipeda minima: an update on its phytochemistry, pharmacology and safety[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 292: 115027.
- [14] Tian Y, Cai L, Tian Y, et al. miR156a mimic represses the epithelial-mesenchymal transition of human nasopharyngeal cancer cells by targeting junctional adhesion molecule A[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0157686.
- [15] 林小龙, 张杰, 林伟. 2022—2026年我国鼻咽癌发病率与死亡率的预测: 基于 GM(1,1) 和 ARIMA 模型[J]. 医学新知, 2025, 35(9): 1017-1023.
- [16] Liu R, Chan BD, Mok DK, et al. Arnicolide D, from the herb Centipeda minima, is a therapeutic candidate against nasopharyngeal carcinoma[J]. Molecules, 2019, 24(10): 1908.
- [17] Liu R, Qu Z, Lin Y, et al. Brevilin A induces cell cycle arrest and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 594.
- [18] Wang X, Liu Y, Dong X, et al. Peu-MIR2916-p3-enriched garlic exosomes ameliorate murine colitis by reshaping gut microbiota, especially by boosting the anti-colitic Bacteroides thetaiotaomicron[J]. Pharmacol Res, 2024, 200: 107071.
- [19] Gismondi A, Nanni V, Monteleone V, et al. Plant miR171 modulates mTOR pathway in HEK293 cells by targeting GNA12[J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(1): 435-449.
- [20] Kumazoe M, Ogawa F, Hikida A, et al. Plant miRNA osa-miR172d-5p suppressed lung fibrosis by targeting Tab1[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 2128.
- [21] Pan Y, Zhou F, Zhang R, et al. Stat3 inhibitor Stattic exhibits potent antitumor activity and induces chemo- and radio-sensitivity in nasopharyngeal carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54565.
- [22] Xu K, Kang Y, Wang J, et al. SYT7 accelerates nasopharyngeal carcinoma progression via ALDH1A3-mediated STAT3 signaling activation[J]. Oncogenesis, 2025, 14(1): 16.
- [23] 董洁, 彭涛, 宋鹏, 等. ShRNA 靶向沉默 VTCN1 基因对鼻咽癌细胞的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2017, 31(10): 797-801.
- [24] Temple AE, Walker SR. The roles of STAT3 and STAT5 in breast cancer[J]. Cancers (Basel), 2025, 17(11): 1781.
- [25] Pan D, Zhang CY, Wang YF, et al. Machine learning-based integration of DCE-MRI radiomics for STAT3 expression prediction and survival stratification in breast cancer[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1619186.
- [26] Clowers MJ, Rahal Z, Cho SN, et al. Selective inhibition of canonical STAT3 signaling suppresses K-ras mutant lung tumorigenesis and reinvigorates anti-tumor immunity[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1575181.
- [27] Guanizo AC, Luong Q, Jayasekara WSN, et al. A STAT3-STING-IFN axis controls the metastatic spread of small cell lung cancer[J]. Nat Immunol, 2024, 25(12): 2259-2269.
- [28] Purcell RV, Permain J, Keenan JL. Enterotoxigenic Bacteroides fragilis activates IL-8 expression through Stat3 in colorectal cancer cells[J]. Gut Pathog, 2022, 14(1): 16.
- [29] Lu X, Jin J, Wu Y, et al. Self-assembled PROTACs enable protein degradation to reprogram the tumor microenvironment for synergistically enhanced colorectal cancer immunotherapy[J].

- Bioact Mater, 2024, 43: 255-272.
- [30] Zhang JG, Zhao J, Xin Y. Significance and relationship between Cripto-1 and p-STAT3 expression in gastric cancer and precancerous lesions[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(5): 571-577.
- [31] D'Amico S, Kirillov V, Liu J, *et al.* STAT3 sustains tumorigenicity following mutant KRAS ablation[J]. EMBO Rep, 2025, 26(20): 4900-4922.
- [32] Xiao J, Wang J, Li J, *et al.* L3MBTL3 and STAT3 collaboratively upregulate SNAIL expression to promote metastasis in female breast cancer[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 231.
- [33] Feng Z, Gao Y, Cai C, *et al.* CSF3R-AS promotes hepatocellular carcinoma progression and sorafenib resistance through the CSF3R/JAK2/STAT3 positive feedback loop[J]. Cell Death Dis, 2025, 16(1): 217.
- [34] Wang G, Xu G, Fan Y, *et al.* EPHA5 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in Follicular Thyroid Cancer *via* the STAT3 signaling pathway[J]. Oncogenesis, 2025, 14(1): 12.
- [35] Li Y, Liang J, Ren X, *et al.* Correction: FGFR3-TACC3 fusion gene promotes glioblastoma malignant progression through the activation of STAT3 signaling pathway[J]. Front Oncol, 2025, 15: 1637363.

(责任编辑: 张小利)

