

• 论 著 •

干漆乙醇提取物通过调控 HOXA-AS3/miR-29b 分子轴抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭诱导凋亡^{*}

董秋月¹, 吴立春², 刘妍乔¹, 何进伟^{1△}

1. 四川省乐山市市中区肿瘤医院检验科, 四川乐山 614000; 2. 四川省肿瘤医院检验科, 四川成都 610041

摘 要:目的 探讨干漆乙醇提取物调控同源盒基因 A 反义转录 3(HOXA-AS3)/微小 RNA(miR)-29b 分子轴对乳腺癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。方法 采用不同水平(0、25、50、75 $\mu\text{g/mL}$)的干漆乙醇提取物处理乳腺癌 T47D 细胞 48 h, CCK-8 和克隆形成实验检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞凋亡, Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力, qRT-PCR 检测 HOXA-AS3 和 miR-29b 的表达。western blot 检测 P21、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)、上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)和基质金属蛋白酶 2(MMP-2)蛋白的表达。将 HOXA-AS3 过表达载体(pcDNA3.1-HOXA-AS3)、miR-29b 抑制物(anti-miR-29b)分别转染 T47D 细胞, 经 75 $\mu\text{g/mL}$ 的干漆乙醇提取物干预后, 采用上述方法检测 T47D 细胞的增殖、迁移、侵袭以及凋亡变化。双荧光素酶报告基因实验以及 qRT-PCR 验证 miR-29b 和 HOXA-AS3 的靶向关系。结果 干漆乙醇提取物处理可促进 T47D 细胞 P21、Caspase-3 和 E-cadherin 表达, 抑制 MMP-2 表达, 抑制细胞增殖、迁移和侵袭, 促进细胞凋亡, 并呈一定的剂量依赖性($P < 0.05$)。干漆乙醇提取物处理可抑制 T47D 细胞 HOXA-AS3 的表达, 促进 miR-29b 的表达, 并呈一定的剂量依赖性($P < 0.05$)。过表达 HOXA-AS3 或抑制 miR-29b 均可逆转干漆乙醇提取物对 T47D 细胞增殖、迁移、侵袭以及凋亡的影响($P < 0.05$)。HOXA-AS3 靶向负性调控 miR-29b 表达。结论 干漆乙醇提取物通过下调 HOXA-AS3/miR-29b 分子轴可抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 诱导细胞凋亡。

关键词:干漆乙醇提取物; 同源盒基因 A 反义转录 3; 微小 RNA-29b; 乳腺癌; 细胞增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.19.018

中图法分类号:R737.9

文章编号:1673-4130(2022)19-2395-08

文献标志码:A

Toxicodendron vernicifluum ethanol extract on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of breast cancer cells by regulating HOXA-AS3/miR-29b molecular axis^{*}

DONG Qiuyue¹, WU Lichun², LIU Yanqiao¹, HE Jinwei^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Leshan Cancer Hospital, Leshan, Sichuan 614000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Sichuan Cancer Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Toxicodendron vernicifluum ethanol extract on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of breast cancer cells by regulating HOXA cluster antisense RNA 3 (HOXA-AS3)/microRNA(miR)-29b molecular axis. **Methods** Breast cancer T47D cells were treated with Toxicodendron vernicifluum ethanol extract of different concentrations(0, 25, 50, 75 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h. Cell proliferation was measured by CCK-8 and clone formation experiments. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. Transwell assay was used to detect cell migration and invasion ability, and qRT-PCR was used to detect the expression of HOXA-AS3 and miR-29b. Western blot was used to detect the expression of P21, Caspase-3, E-cadherin and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) proteins. HOXA-AS3 overexpression vector (pcDNA3.1-HOXA-AS3) and miR-29b inhibitor(anti-miR-29b) were transfected into T47D cells respectively, and after intervention with 75 $\mu\text{g/mL}$ Toxicodendron vernicifluum ethanol extract, the proliferation, migration, invasion and apoptosis of T47D cells were detected by the above methods. Luciferase reporter gene assay and RT-qPCR were used to verify the targeting relationship between miR-29b and HOXA-AS3. **Results** Toxicodendron vernicifluum ethanol extract treatment could promote the expression of P21, Caspase-3 and E-cadherin in T47D cells, inhibit the expression of MMP-2, inhibit the proliferation, migration and invasion of T47D

^{*} 基金项目:乐山市科技局重点研究项目(20ZDYJ0041)。

作者简介:董秋月,女,主管技师,主要从事临床检验诊断方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail:648427571@qq.com。

cells, and promote cell apoptosis, and it was dose-dependent ($P < 0.05$). Toxicodendron vernicifluum ethanol extract treatment could inhibit the expression of HOXA-AS3 and promote the expression of miR-29b in T47D cells, and it was dose-dependent ($P < 0.05$). Overexpression of HOXA-AS3 or inhibition of miR-29b could reverse the effects of Toxicodendron vernicifluum ethanol extract on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of T47D cells ($P < 0.05$). HOXA-AS3 targeted and negatively regulated miR-29b expression. **Conclusion** Toxicodendron vernicifluum ethanol extract could inhibit the proliferation, migration, invasion and induce apoptosis of breast cancer cells by down-regulating HOXA-AS3/miR-29b molecular axis.

Key words: Toxicodendron vernicifluum ethanol extract; HOXA cluster antisense RNA 3; microRNA-29b; breast cancer; cell proliferation; apoptosis; migration invasion

2020 年全球女性乳腺癌新发病例 2 260 000 例, 死亡病例 680 000 例, 已超越肺癌成为全球第一大癌症^[1-2]。乳腺癌病例发现时多数已经是中晚期, 且复发率高、五年生存期短, 给患者及其家庭带来巨大的经济压力和精神负担^[3-4]。因此, 寻找高效、低毒的抗乳腺癌药物是当前亟待解决的重大课题。

干漆是我国传统中药之一。近年研究显示, 干漆乙醇提取物可抑制乳腺癌实体肿瘤生长及其相关的肺转移^[5], 但其抗肿瘤机制目前尚未完全阐明。微小 RNA(miR)-29b 是一种抑癌基因, 与肝癌、胆管癌、结直肠癌、前列腺癌等恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[6-9]; 同时 miR-29b 在乳腺癌中表达下调, 高表达 miR-29b 能抑制乳腺癌增殖, 诱导凋亡等生物学进程^[10]。生物信息学分析显示长链非编码 RNA(lncRNA) 同源盒基因 A 反义转录 3(HOXA-AS3) 和 miR-29b 之间存在相互作用。HOXA-AS3 高表达能促进肺癌^[11]、胶质瘤^[12]的进展, 但干漆乙醇提取物能否调控 HOXA-AS3/miR-29b 分子轴进而影响乳腺癌细胞的生物学行为尚不清楚。本研究拟通过观察不同水平的干漆乙醇提取物对乳腺癌细胞 T47D 增殖、迁移、侵袭、凋亡以及 HOXA-AS3 和 miR-29b 表达的影响, 初步探讨干漆乙醇提取物调控乳腺癌生物学行为的分子机制, 为干漆乙醇提取物防治乳腺癌提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂 人乳腺癌细胞 T47D 购于美国模式培养物集存库; DMEM 培养基和胎牛血清购于美国 Gibco 公司; 干漆购于中药材批发市场; 细胞转染试剂 Lipofectamine™ 2000、TRIzol 试剂盒购于美国 Invitrogen 公司; 微小 RNA(miRNA) 抑制物阴性对照(anti-miR-NC)、miR-29b 抑制物(anti-miR-29b)、空载体(pcDNA)、HOXA-AS3 过表达载体(pcDNA-HOXA-AS3)、HOXA-AS3 小干扰 RNA(si-HOXA-AS3)、HOXA-AS3 小干扰 RNA 阴性对照(si-NC)由上海生工生物工程有限公司提供; miR cDNA 第一链合成试剂盒、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒购于大连 Takara 公司; Transwell 小室和基质胶购于美国 BD 公司; CCK-8 试剂盒、膜联蛋白 V 异硫氰酸荧

光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)双染细胞凋亡检测试剂盒购于杭州贝博生物技术公司; 兔源 P21、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)、上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)和磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体购于美国 CST 公司; 山羊抗兔二抗购于南京金斯瑞生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 干漆乙醇提取物的制备^[13] 将 100 g 干燥的干漆粉碎为粗粉, 置于容器内, 以料液比 1:3 比例加入 95% 乙醇冷浸 72 h, 用纱布过滤, 得滤液。重复冷浸提取 3 次, 合并滤液, 在 40 °C 下减压浓缩并回收乙醇至无醇味, 冷冻干燥, 得干漆乙醇提取物, -20 °C 保存备用。提取率为 10.5%。

1.2.2 细胞培养和分组 乳腺癌细胞 T47D 采用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。采用不同水平(0、25、50、75 μg/mL)的干漆乙醇提取物处理 T47D 细胞 48 h, 检测细胞增殖抑制率、克隆形成、迁移、侵袭、凋亡以及 HOXA-AS3 和 miR-29b 表达的变化, 确定后续实验干漆乙醇提取物使用水平。为验证干漆乙醇提取物是通过调控 HOXA-AS3/miR-29b 分子轴进而影响乳腺癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭, 利用 Lipofectamine™ 2000 将 pcDNA 3.1、pcDNA 3.1-HOXA-AS3、anti-miR-NC、anti-miR-29b 分别转染 T47D 细胞, 转染成功的 T47D 细胞用 75 μg/mL 的干漆乙醇提取物干预 48 h, 依次记为干漆 75 μg/mL + pcDNA3.1 组、干漆 75 μg/mL + pcDNA3.1-HOXA-AS3 组、75 μg/mL + anti-miR-NC 组、干漆 75 μg/mL + anti-miR-29b 组, 检测 T47D 细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡变化。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞活力 将 1×10^4 个 T47D 细胞铺于 96 孔板, 根据实验分组进行相应细胞处理后, 向各孔内加入 10 μL 的 CCK-8 试剂, 继续孵育 2 h, 酶标仪检测 450 nm 处各孔的吸光度值, 计算细胞增殖抑制率。

1.2.4 克隆形成实验检测细胞克隆能力 细胞按照上述分组进行干预后, 用胰酶消化细胞, 取 2×10^3 个细胞接种于 6 孔板, 将细胞均匀分散后, 置于细胞培养箱常规培养 7 d, 当看到肉眼可见的集落时, 弃去培

培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 1 次,分别加入多聚甲醛和结晶紫染液进行固定和染色,PBS 冲洗 3 次,常温晾干后,显微镜下统计>50 个细胞的集落数。

1.2.5 流式细胞术检测凋亡 收集上述各组细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,离心后加入适量结合缓冲液调整为 1×10^6 cells/mL 的单细胞悬液。取 100 μ L 细胞悬液加入到流式管,按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒分别加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 和 5 μ L 的 PI,避光孵育 15 min,加入 400 μ L 结合缓冲液混匀,采用流式细胞术检测细胞凋亡情况。

1.2.6 Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力 侵袭实验:在小室内铺上用 PBS 1:8 稀释的 Matrigel(50 mg/L)基质胶备用。收集上述各组细胞,采用不含血清的培养基调整细胞水平为 3×10^6 cells/mL。将 Transwell 小室放入 24 孔板,向上室内加入 300 μ L 的细胞悬液,下室加入含 20%血清的细胞培养液,培养箱孵育 24 h,小心擦去未过膜细胞,4%的多聚甲醛固定 10 min,0.1%的结晶紫染色 5 min,PBS 洗涤后,将 Transwell 小室倒置于显微镜下拍照,随机选取 3 个视野拍照,记录过膜细胞数,其平均值即为细胞侵袭数目。迁移实验采用未包被基质胶的 Transwell 小室,其他步骤同上。

1.2.7 qRT-PCR 检测 HOXA-AS3 和 miR-29b 的表达 TRIzol 试剂盒提取各组的细胞总 RNA,并分别应用 miR cDNA 第一链合成试剂盒和 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒合成 cDNA 模板,采用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 进行 qRT-PCR 检测。分别以 U6 和 GAPDH 为内参照检测 miR-29b 和 HOXA-AS3 的表达。应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-29b 和靶标 HOXA-AS3 的表达量。引物由北京华大基因公司合成,序列如下。HOXA-AS3 上游 5'-GCTGAATTAACGGTGGCTCC-3',HOXA-AS3 下游 5'-ATGGCGAGCGAAGGGAAG-3';GAPDH 上游 5'-TTAAAAGCAGCCCTGGTGAC-3',GAPDH 下游 5'-CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3';miR-29b 上游 5'-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-3';miR-29b 下游 5'-CACUGAUUUCAAAUGGUGUUAUU-3';U6 上游 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3',U6 下游 5'-AACGCTTCTCACGAATTTGCGT-3'。

1.2.8 Western blot 检测 P21、Caspase-3、E-cadherin 和 MMP-2 蛋白的表达 各组细胞进行相应处理后弃去细胞培养液,加入 4 $^{\circ}$ C 预冷的细胞裂解液,冰上裂解 30 min 后提取细胞总蛋白。BCA 试剂盒测定细胞蛋白水平。煮沸 3 min 变性细胞蛋白。配制分离胶和浓缩胶,每孔上样 30 μ g,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,分别加入稀释的 P21、Caspase-3、E-cadherin、MMP-2 和 GAPDH 抗体后,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次后,加入稀释的二抗溶液,室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次后,用增强型化学发光试剂盒显色。以 GAPDH 为内参,采用图像处理软件 ImageJ 分析目的条带灰度值。

1.2.9 双荧光素酶报告基因实验 采用 Targetscan 数据库进行靶基因预测显示,HOXA-AS3 与 miR-29b 之间存在部分连续结合的核苷酸序列,并采用双荧光酶报告基因实验验证 miR-29b 和 HOXA-AS3 的靶向关系。含有 miR-29b 结合位点的野生型荧光素酶报告基因载体 WT-HOXA-AS3 和突变型荧光素酶报告基因载体 MUT-HOXA-AS3 的构建由上海吉凯基因提供。将 WT-HOXA-AS3、MUT-HOXA-AS3 分别与 miR-con、miR-29b mimics 共转染至 T47D 细胞,转染 48 h,检测各组细胞的荧光素酶活性。为进一步验证 HOXA-AS3 对 miR-29b 的调控关系,将 pcDNA3.1、pcDNA3.1-HOXA-AS3、si-NC、si-HOXA-AS3 分别转染至 T47D 细胞,转染 48 h,采用 qRT-PCR 检测 miR-29b 的表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,各组间数据的两两比较采用 SNK-*q* 检验进行分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 干漆乙醇提取物对细胞 T47D 增殖、凋亡的影响 与空白对照组比较,干漆乙醇提取物处理组 T47D 细胞 P21 和 Caspase-3 蛋白的表达显著升高,细胞抑制率显著升高,克隆形成数显著降低,细胞凋亡率显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 干漆乙醇提取物对细胞 T47D 增殖、凋亡的影响($\bar{x}\pm s$)

药物水平(μ g/mL)	P21	Caspase-3	细胞抑制率(%)	克隆形成数	细胞凋亡率(%)
0	0.14 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.02	1.03 $\pm$ 0.11	152.00 $\pm$ 15.01	7.29 $\pm$ 0.86
25	0.29 $\pm$ 0.03 [*]	0.42 $\pm$ 0.04 [*]	17.26 $\pm$ 1.75 [*]	127.00 $\pm$ 12.14 [*]	15.12 $\pm$ 1.38 [*]
50	0.50 $\pm$ 0.05 [*]	0.59 $\pm$ 0.06 [*]	42.68 $\pm$ 4.17 [*]	91.00 $\pm$ 8.84 [*]	21.01 $\pm$ 2.00 [*]
75	0.71 $\pm$ 0.07 [*]	0.75 $\pm$ 0.07 [*]	58.31 $\pm$ 5.66 [*]	67.00 $\pm$ 6.36 [*]	26.37 $\pm$ 2.46 [*]

注:与 0 μ g/mL 比较,^{*} $P<0.05$ 。

2.2 干漆乙醇提取物对细胞 T47D 迁移、侵袭的影响

与空白对照组比较,干漆乙醇提取物处理组

T47D 细胞 E-cadherin 蛋白的表达显著升高, MMP-2 蛋白的表达显著降低, 迁移和侵袭细胞数目显著减少, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。随着干漆乙醇

提取物水平的逐渐增加, 其对 T47D 细胞迁移、侵袭的抑制作用逐渐增强。见图 2、表 2。

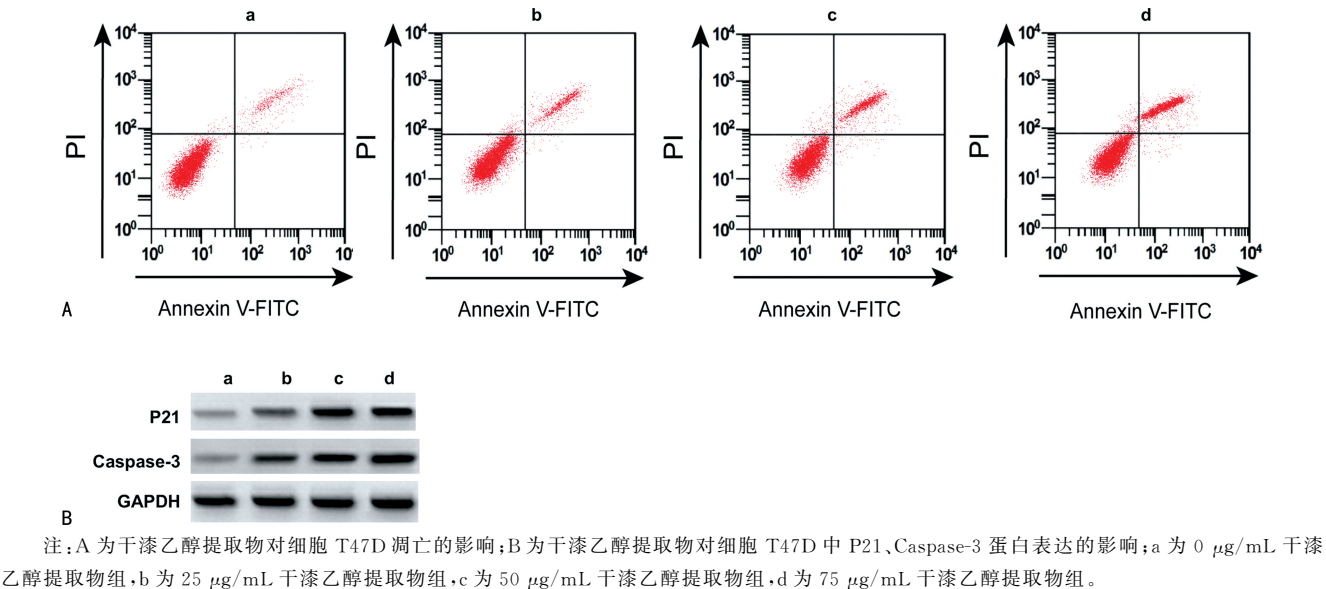


图 1 干漆乙醇提取物对细胞 T47D 增殖、凋亡的影响

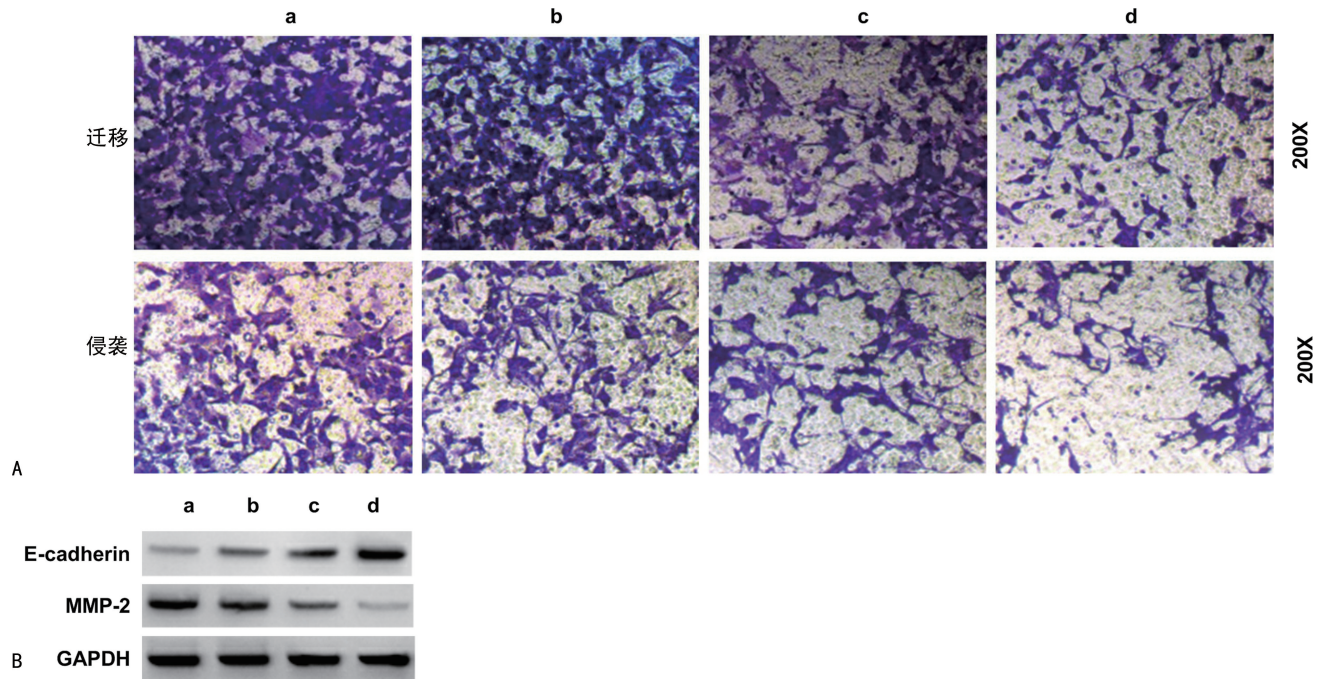


图 2 干漆乙醇提取物对细胞 T47D 迁移、侵袭的影响

表 2 干漆乙醇提取物对细胞 T47D 迁移、侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

药物水平 ($\mu\text{g/mL}$)	E-cadherin	MMP-2	迁移细胞数	侵袭细胞数
0	0.23 $\pm$ 0.02	0.85 $\pm$ 0.08	268.00 $\pm$ 25.34	153.00 $\pm$ 15.11
25	0.41 $\pm$ 0.04 *	0.67 $\pm$ 0.07 *	210.00 $\pm$ 20.05 *	123.00 $\pm$ 12.22 *
50	0.62 $\pm$ 0.06 *	0.43 $\pm$ 0.04 *	140.00 $\pm$ 13.03 *	99.00 $\pm$ 10.01 *
75	0.83 $\pm$ 0.08 *	0.24 $\pm$ 0.02 *	96.00 $\pm$ 10.08 *	65.00 $\pm$ 6.28 *

注: 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较, * $P<0.05$ 。

2.3 干漆乙醇提取物对细胞 T47D 中 HOXA-AS3、miR-29b 表达的影响 与空白对照组比较,干漆乙醇提取物处理组 T47D 细胞 HOXA-AS3 的表达显著降低($P<0.05$),miR-29b 的表达显著升高($P<0.05$)。随着干漆乙醇提取物水平的逐渐升高,其对 T47D 细胞中 HOXA-AS3 和 miR-29b 表达的影响逐渐增强。见表 3。

2.4 过表达 HOXA-AS3 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 增殖、凋亡的影响 与干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + pcDNA3.1 组比较,干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + pcDNA3.1-HOXA-AS3 组 T47D 细胞 P21 和 Caspase-3 蛋白的表达显著降低,细胞抑制率显著降低,克隆形成数显著增多,细胞凋亡率显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 3、表 4。

2.5 过表达 HOXA-AS3 能逆转干漆乙醇提取物对

细胞 T47D 迁移、侵袭的影响 与干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + pcDNA3.1 组比较,干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + pcDNA3.1-HOXA-AS3 组 T47D 细胞 HOXA-AS3 的表达显著升高,E-cadherin 蛋白的表达显著降低,MMP-2 蛋白的表达显著升高,迁移和侵袭细胞数目显著增多,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 4、表 5。

表 3 干漆乙醇提取物对细胞 T47D 中 HOXA-AS3、miR-29b 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

药物水平($\mu\text{g/mL}$)	HOXA-AS3	miR-29b
0	1.02 ± 0.10	0.99 ± 0.10
25	$0.82\pm 0.08^*$	$1.25\pm 0.11^*$
50	$0.56\pm 0.05^*$	$1.56\pm 0.15^*$
75	$0.37\pm 0.03^*$	$1.95\pm 0.20^*$

注:与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,* $P<0.05$ 。

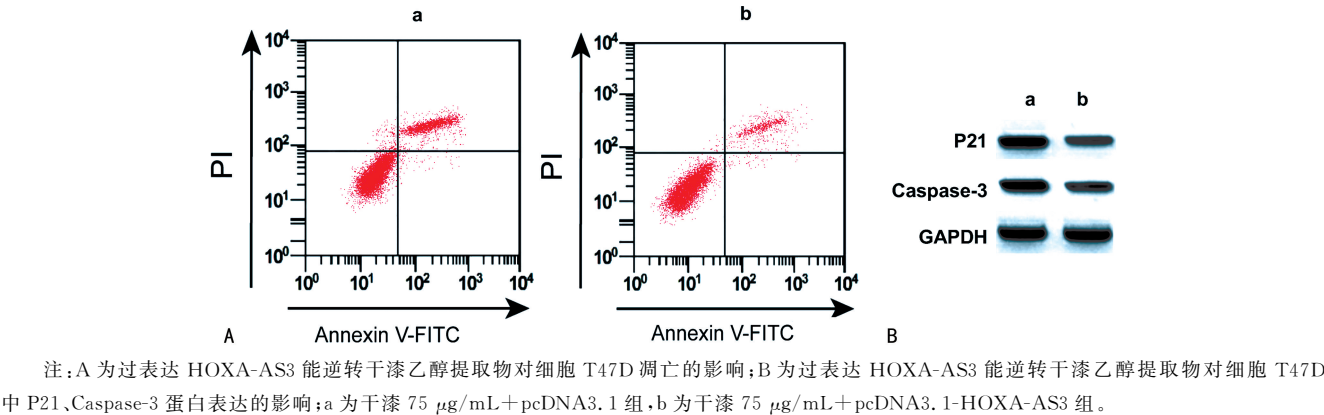


图 3 过表达 HOXA-AS3 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 增殖、凋亡的影响

表 4 过表达 HOXA-AS3 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 增殖、凋亡的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	P21	Caspase-3	细胞抑制率(%)	克隆形成数	细胞凋亡率(%)
干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + pcDNA3.1 组	0.72 ± 0.07	0.77 ± 0.07	58.63 ± 5.68	66.00 ± 6.33	26.45 ± 2.49
干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + pcDNA3.1-HOXA-AS3 组	$0.26\pm 0.02^*$	$0.34\pm 0.03^*$	$15.69\pm 1.55^*$	$134.00\pm 13.15^*$	$11.29\pm 1.26^*$

注:与干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + pcDNA3.1 组比较,* $P<0.05$ 。

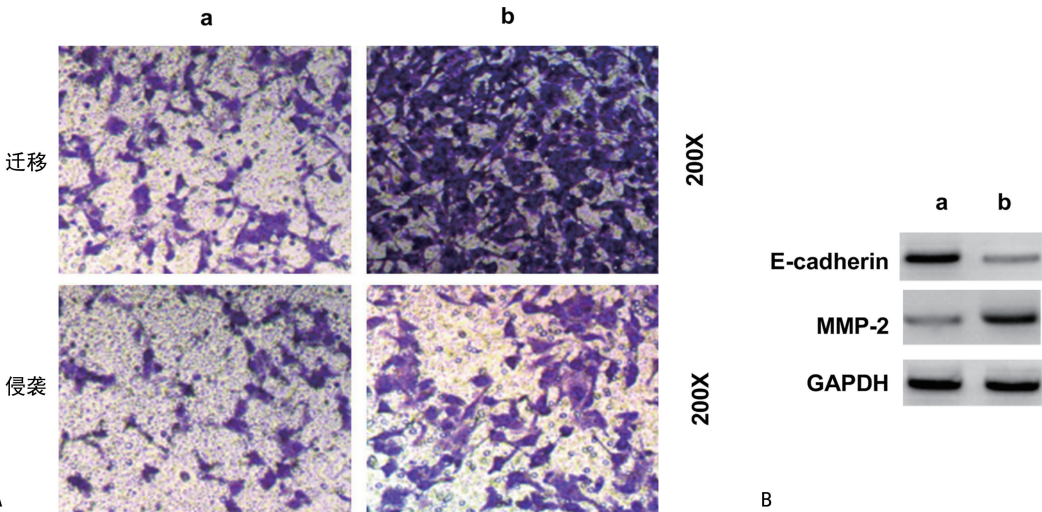


图 4 过表达 HOXA-AS3 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 迁移、侵袭的影响

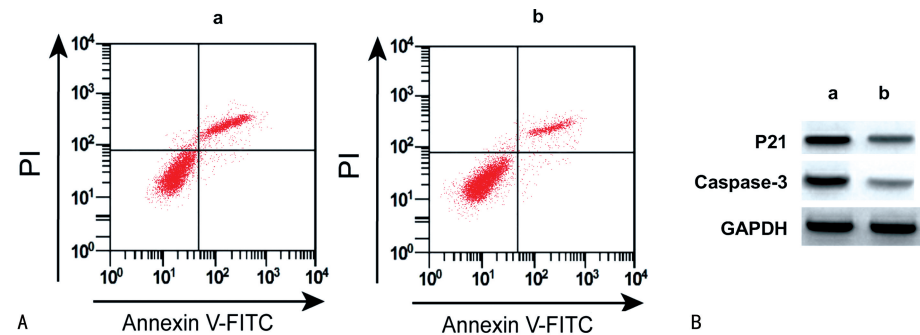
表 5 过表达 HOXA-AS3 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 迁移、侵袭的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	HOXA-AS3	E-cadherin	MMP-2	迁移细胞数	侵袭细胞数
干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + pcDNA3.1 组	1.01 $\pm$ 0.10	0.82 $\pm$ 0.08	0.21 $\pm$ 0.02	98.00 $\pm$ 10.21	64.00 $\pm$ 6.23
干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + pcDNA3.1-HOXA-AS3 组	2.25 $\pm$ 0.22 *	0.32 $\pm$ 0.03 *	0.75 $\pm$ 0.07 *	220.00 $\pm$ 20.35 *	109.00 $\pm$ 10.31 *

注:与干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + pcDNA3.1 组比较, * $P < 0.05$ 。

2.6 抑制 miR-29b 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 增殖、凋亡的影响 与干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + anti-miR-NC 组比较,干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + anti-miR-29b 组 T47D 细胞 P21 和 Caspase-3 蛋白的表达显著降低,细胞抑制率显著降低,克隆形成数显著增多,细胞凋亡率显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5、表 6。

2.7 抑制 miR-29b 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 迁移、侵袭的影响 与干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + anti-miR-NC 组比较,干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + anti-miR-29b 组 T47D 细胞 miR-29b 的表达显著降低,E-cadherin 蛋白的表达显著降低,MMP-2 蛋白的表达显著升高,迁移和侵袭细胞数目显著增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 6、表 7。



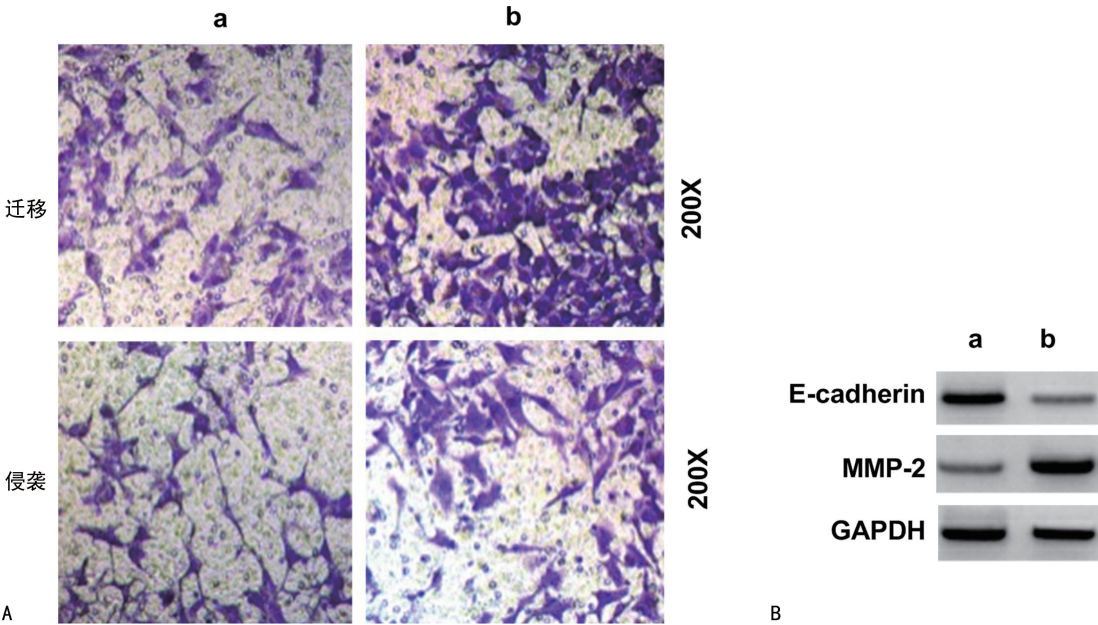
注:A为抑制 miR-29b 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 凋亡的影响;B为抑制 miR-29b 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 中 P21、Caspase-3 蛋白表达的影响;a 为干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + anti-miR-NC 组,b 为干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + anti-miR-29b 组。

图 5 抑制 miR-29b 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 增殖、凋亡的影响

表 6 抑制 miR-29b 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 增殖、凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	P21	Caspase-3	细胞抑制率(%)	克隆形成数	细胞凋亡率(%)
干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + anti-miR-NC 组	0.73 $\pm$ 0.07	0.74 $\pm$ 0.07	58.52 $\pm$ 5.65	68.00 $\pm$ 6.39	26.33 $\pm$ 2.42
干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + anti-miR-29b 组	0.33 $\pm$ 0.03 *	0.38 $\pm$ 0.04 *	22.31 $\pm$ 2.24 *	119 $\pm$ 12.03 *	15.37 $\pm$ 1.54 *

注:与干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + anti-miR-NC 组比较, * $P < 0.05$ 。



注:A为抑制 miR-29b 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 迁移、侵袭能力的影响;B为抑制 miR-29b 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 中 E-cadherin、MMP-2 蛋白表达的影响;a 为干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + anti-miR-NC 组,b 为干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ + anti-miR-29b 组。

图 6 抑制 miR-29b 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 迁移、侵袭的影响

表 7 抑制 miR-29b 能逆转干漆乙醇提取物对细胞 T47D 迁移、侵袭的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-29b	E-cadherin	MMP-2	迁移细胞数	侵袭细胞数
干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ +anti-miR-NC 组	0.97 $\pm$ 0.10	0.80 $\pm$ 0.08	0.23 $\pm$ 0.02	97.00 $\pm$ 10.06	66.00 $\pm$ 6.35
干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ +anti-miR-29b 组	0.21 $\pm$ 0.02 [*]	0.36 $\pm$ 0.04 [*]	0.66 $\pm$ 0.06 [*]	196.00 $\pm$ 18.57 [*]	102.00 $\pm$ 10.04 [*]

注:与干漆 75 $\mu\text{g/mL}$ +anti-miR-NC 组比较,^{*} $P<0.05$ 。

2.8 HOXA-AS3 靶向调控 miR-29b Starbase 预测显示 HOXA-AS3 与 miR-29b 之间存在本分连续结合位点,见图 7。双荧光素酶报告实验显示,与 miR-NC 和 WT-HOXA-AS3 共转染组比较,miR-29b 和 WT-HOXA-AS3 共转染组 T47D 细胞的荧光素酶活性显著降低($P<0.05$);与 miR-NC 和 MUT-HOXA-AS3 共转染组比较,miR-29b 和 MUT-HOXA-AS3 共转染组 T47D 细胞的荧光素酶活性变化差异无统计学意义($P>0.05$),见表 8。qRT-PCR 检测显示,与 pcDNA3.1 组比较,pcDNA3.1-HOXA-AS3 组 T47D 细胞 miR-29b 的表达显著降低($P<0.05$);与 si-NC 组比较,si-HOXA-AS3 组 T47D 细胞 miR-29b 的表达显著升高($P<0.05$),见表 9。提示 HOXA-AS3 靶向 miR-29b 并负性调控其表达。



图 7 HOXA-AS3 靶向 miR-29b

表 8 双荧光素酶报告实验($\bar{x} \pm s$)

组别	WT-HOXA-AS3	MUT-HOXA-AS3
miR-NC 组	0.97 $\pm$ 0.10	0.94 $\pm$ 0.10
miR-29b 组	0.26 $\pm$ 0.02 [*]	0.96 $\pm$ 0.10

注:与 miR-NC 组比较,^{*} $P<0.05$ 。

表 9 HOXA-AS3 调控 miR-29b 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-29b
pcDNA3.1 组	1.00 $\pm$ 0.10
pcDNA3.1-HOXA-AS3 组	0.31 $\pm$ 0.03 [*]
si-NC 组	1.04 $\pm$ 0.10
si-HOXA-AS3 组	2.27 $\pm$ 0.23 [#]

注:与 miR-NC 组比较,^{*} $P<0.05$;与 anti-miR-NC 组比较,[#] $P<0.05$ 。

3 讨 论

近年来乳腺癌的发病率和病死率不断升高并呈现年轻化趋势,虽然治疗手段及其方案不断完善,但临床治疗效果并不显著。研究显示,中药辅助治疗在提高乳腺癌患者 5 年生存率和延长生存期方面发挥重要作用^[14]。

干漆又名漆渣、漆底、漆脚、续命筒、黑漆,历版《中国药典》均有收录,具有破瘀血、消积、杀虫等功效,主要用于治疗妇女经闭、瘀血、虫积、肝脏疾病、胃病和传染病等^[15]。现代生物医学研究表明,干漆乙醇提取物具有显著的抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤和神经

保护作用^[16-18]。研究证实,干漆乙醇提取物可抑制人肺癌细胞 A549 以及人慢性粒细胞白血病 K562 细胞的生长并诱导凋亡作用^[19-20],抑制胰腺癌细胞的迁移和侵袭^[21];与此同时,干漆乙醇提取物还可通过腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)和 p53 途径分别调节乳腺癌细胞的存活和凋亡^[22-23]。本研究结果显示,干漆乙醇提取物呈剂量依赖性地抑制乳腺癌细胞 T47D 增殖,抑制 MMP-2 表达,促进 P21、Caspase-3 和 E-cadherin 表达,抑制其迁移和侵袭,并诱导细胞凋亡,抑制乳腺癌细胞的恶性生物学行为。

miRNA 广泛参与肿瘤进展的多个生物学过程,近年来其被认为是中药化合物抗肿瘤的潜在靶点^[24]。miR-29b 是 miR-29 家族成员之一,研究显示乳腺癌等多种癌症中 miR-29b 异常表达,与癌细胞增殖、分化、凋亡、转移和药物耐受相关^[25]。本研究结果显示,干漆乙醇提取物呈剂量依赖性地促进 T47D 细胞 miR-29 表达,抑制 miR-29 表达可逆转干漆乙醇提取物对 T47D 细胞的凋亡诱导以及增殖、迁移、侵袭抑制的影响,提示 miR-29b 可能是干漆乙醇提取物抗乳腺癌的作用靶点。HOXA-AS3 是一种新型的 lncRNA,已有研究表明肝癌中 HOXA-AS3 表达上调,下调 HOXA-AS3 表达通过抑制丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶(MEK/ERK)信号通路进而抑制肝癌细胞增殖、转移和上皮间质转化(EMT)进程^[26]。下调 HOXA-AS3 表达还可增强顺铂对非小细胞肺癌的体内外疗效^[27]。本研究结果显示,干漆乙醇提取物呈剂量依赖性地抑制 T47D 细胞 HOXA-AS3 表达;本研究还发现,过表达 HOXA-AS3 可逆转干漆乙醇提取物对 T47D 细胞增殖、迁移、侵袭以及凋亡的影响。此外,双荧光素酶报告基因实验和 Western blot 证实,HOXA-AS3 靶向 miR-29b 并负性调控 miR-29b 表达。因此,调控 HOXA-AS3/miR-29b 分子轴是干漆乙醇提取物调控乳腺癌细胞恶性生物学行为的重要机制。有研究报道,漆酚可能是干漆乙醇提取物的主要化学成分^[28-29],但漆酚是否是其发挥抗癌作用的主要成分还有待后续试验进行深层次研究。

参考文献

[1] 曹毛毛,陈万青. GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读[J/CD]. 中国医学前沿杂志(电子版),2021,13(3):63-69.
[2] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chin Med J

- (Engl), 2021, 134(7):783-791.
- [3] 张佳玉, 李文倩, 赵博志, 等. 三阴性乳腺癌的治疗现状及研究新方向[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(21):173-176.
- [4] MUSALLAM R, ALNAJJAR M, AL-SHURAF A, et al. Clinical and pathological characteristics and hormone receptor status of women with breast cancer in the European Gaza Hospital: a retrospective chart-based review [J]. Lancet, 2021, 398(S1):S38.
- [5] LEE H S, JUNG J I, KIM K H, et al. Toxicodendron vernicifluum stokes extract inhibits solid tumor growth and lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells in BALB/c mice[J]. PLoS One, 2020, 15(11):e0241805.
- [6] HOZAKA Y, SEKI N, TANAKA T, et al. Molecular pathogenesis and regulation of the miR-29-3p-family; involvement of ITGA6 and ITGB1 in intra-hepatic cholangiocarcinoma[J]. Cancers(Basel), 2021, 13(11):2804.
- [7] PIDÍKOVÁ P, HERICHOVÁ I. miRNA clusters with up-regulated expression in colorectal cancer[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(12):2979.
- [8] LIU Y L, YANG W H, CHEN B Y, et al. miR-29b suppresses proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma ascites H22 cells via regulating TGF- β 1 and p53 signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2021, 48(2):157.
- [9] ENRIQUEZ C, CANCELILA V, FERRI R, et al. Castration-induced downregulation of SPARC in stromal cells drives neuroendocrine differentiation of prostate cancer [J]. Cancer Res, 2021, 81(16):4257-4274.
- [10] 付莹. miR-29b 靶向作用于 HER-2 对乳腺癌细胞生物学功能的影响[D]. 南昌:南昌大学, 2016.
- [11] ZHANG H, LIU Y, YAN L, et al. Increased levels of the long noncoding RNA, HOXA-AS3, promote proliferation of A549 cells[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6):707-717.
- [12] WU F, ZHANG C, CAI J, et al. Upregulation of long noncoding RNA HOXA-AS3 promotes tumor progression and predicts poor prognosis in glioma[J]. Oncotarget, 2017, 8(32):53110-53123.
- [13] 程永现, 吕青. 干漆提取物及其作为有效成份的抗癌药物:CN101732373A[P]. 2010-06-16.
- [14] 中国中西医结合学会肿瘤专业委员会, 北京乳腺病防治学会中西医结合专业委员会, 北京中西医慢病防治促进会乳腺癌整合防治全国专家委员会. 乳腺癌中西医结合诊疗共识[J/CD]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2021, 13(7):44-64.
- [15] KIM J H, SHIN Y C, KO S G. Integrating traditional medicine into modern inflammatory diseases care: multi-targeting by Rhus verniciflua Stokes[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014:154561.
- [16] CHOI H S, SEO H S, KIM S R, et al. Anti-inflammatory and anti-proliferative effects of Rhus verniciflua Stokes in RAW264. 7 cells[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(1):311-315.
- [17] LI M, FAN Y, ZHONG T, et al. The protective effects of vernicilignan A, a new flavonolignan isolated from toxicodendron vernicifluum on SH-SY5Y cells against oxidative stress-induced injury [J]. Fitoterapia, 2019, 134(1):81-87.
- [18] SARAVANAKUMAR K, CHELLIAH R, HU X, et al. Antioxidant, anti-lung cancer, and anti-bacterial activities of Toxicodendron vernicifluum[J]. Biomolecules, 2019, 9(4):E127.
- [19] JANG I S, PARK J W, JO E B, et al. Growth inhibitory and apoptosis-inducing effects of allergen-free Rhus verniciflua Stokes extract on A549 human lung cancer cells [J]. Oncol Rep, 2016, 36(5):3037-3043.
- [20] LEE K W, UM E S, JUNG B B, et al. Rhus verniciflua Stokes extract induces inhibition of cell growth and apoptosis in human chronic myelogenous leukemia K562 cells [J]. Oncol Rep, 2018, 39(3):1141-1147.
- [21] KANG Y, YOON S W, PARK B. Allergen-removed Rhus verniciflua Stokes suppresses invasion and migration of pancreatic cancer cells through downregulation of the JAK/STAT and Src/FAK signaling pathways[J]. Oncol Rep, 2018, 40(5):3060-3068.
- [22] LEE J O, MOON J W, LEE S K, et al. Rhus verniciflua extract modulates survival of MCF-7 breast cancer cells through the modulation of AMPK-pathway [J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(5):794-801.
- [23] KIM M S, LEE C W, KIM J H, et al. Extract of Rhus verniciflua Stokes induces p53-mediated apoptosis in MCF-7 breast cancer cells[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019(1):9407340-9407350.
- [24] 周红光, 李黎, 李沐涵, 等. miRNA 是中医药防治恶性肿瘤的新靶标[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11):4531-4534.
- [25] 唐金舟, 毛爱红, 廖世奇. miRNA-29b 在癌症发生发展中的作用机制及其临床应用的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 147(12):119-125.
- [26] TONG Y, WANG M, DAI Y, et al. LncRNA HOXA-AS3 sponges miR-29c to facilitate cell proliferation, metastasis, and EMT process and activate the MEK/ERK signaling pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Hum Gene Ther Clin Dev, 2019, 30(3):129-141.
- [27] LIN S, ZHANG R, AN X, et al. LncRNA HOXA-AS3 confers cisplatin resistance by interacting with HOXA3 in non-small-cell lung carcinoma cells[J]. Oncogenesis, 2019, 8(11):60-70.
- [28] 孙羽灵. 山药抗炎活性物质的分离纯化及其机制研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2020.
- [29] 蒋颖. 漆树科漆属的系统发育和生物地理研究[D]. 吉首:吉首大学, 2019.