

槐耳清膏对肺癌细胞 microRNA 表达的影响*

文/吴唐维^{1,2} 陈卫群¹ 王卉¹ 刘水逸¹ 王静¹ 孔庆志¹ 宁勇² 卢忠心^{1,2}

(1 武汉市中心医院, 湖北 武汉 430014; 2 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065)

摘要: 本文通过探讨槐耳清膏作用前后人肺腺癌细胞 A549 中 microRNA (miRNA) 的表达差异。用槐耳清膏处理 A549 细胞, 24 小时后提取总 RNA, 应用 Agilent human miRNA 芯片检测 microRNA 表达谱。GeneSpring GX 11.0 数据分析挑选差异表达基因, 同时用实时定量反转录聚合酶链反应验证 miRNAs 芯片结果的可靠性。与对照组相比, 槐耳清膏处理后的 A549 细胞中, 有 66 个 miRNA 存在明显差异, 其中表达上调和表达下调的各有 33 个。miR-30d 的验证结果与芯片检测结果具有较好的一致性。说明: 槐耳清膏处理能够影响肺癌细胞中 miRNA 的表达, miRNA 可能参与槐耳清膏抗肿瘤的过程中, 这为槐耳清膏抗癌机制的阐明提供了新的依据和研究思路。

关键词: 槐耳清膏; microRNAs; 肺腺癌; miRNA 芯片

DOI: 10.3772/j.issn.1009-5659.2013.07.005

槐耳是一种生长在中国古槐树上的药用真菌——槐栓菌, 其入药史已有 1600 余年^[1]。槐耳清膏是槐耳的热水提取物, 其主要活性成分为蛋白多糖 (PS-T)^[2]。已有研究表明, 槐耳清膏可能通过调节 Bcl-2、STAT3、BAX、caspase-3、VEGF、TIMP21 等基因的表达来抑制肿瘤细胞增殖, 促进细胞凋亡, 抑制肿瘤的血管生成和侵袭转移^[3-5]。虽然前期研究已取得一些进展, 但槐耳清膏抗肿瘤的作用机制仍有待进一步阐明。microRNA (miRNA) 是一类长度约为 22 个核苷酸的非编码小分子 RNA。已被鉴定的人类 miRNA 超过 1000 多种, 虽然这些 miRNA 仅占人类基因组的 1%~3%, 但它们却调控着超过 30% 的人类基因^[6-7]。近些年的研究显示, miRNA 广泛参与姜黄素、白藜芦醇、羟基喜树碱、紫

杉醇等中药抗肿瘤的作用过程中^[8-11]。但是到目前为止尚没有研究报道 miRNA 在槐耳清膏抗肿瘤中的作用。

本研究利用 Agilent human miRNA 芯片, 分析槐耳清膏处理前后肺腺癌 A549 细胞的 miRNA 的表达谱差异, 初步探讨 miRNA 在槐耳清膏抗肿瘤机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

槐耳清膏由江苏启东盖天力制药有限公司提供, 精确称取槐耳清膏, 以双蒸水溶解, 使其终浓度为 100mg/ml, 以 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌, 即配即用。RPMI-1640 购自 Gibco 公司; mirVana™miRNA Isolation Kit 购自 Ambion 公司; TaqMan®MicroRNA Reverse Transcription、TaqMan® MicroRNA Assays 试剂盒、实时定量反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 系统购自 Applied biosystem 公司; miRNA 标记和杂交试剂盒、人 miRNA 8×15K 芯片 (18.0)、Feature Extraction 10.7 软件、GeneSpring(GX10.0) 软件购自美国 Agilent 公司。

1.2 细胞培养

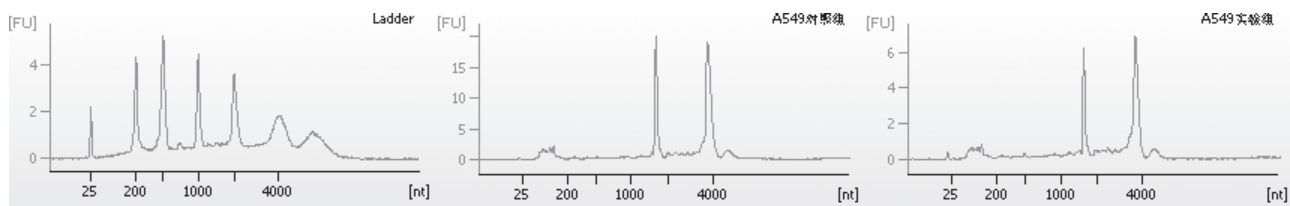
肺腺癌 A549 细胞由武汉大学中南医院惠赠。用含 10% 胎牛血清和 5% 青霉素-链霉素的 RPMI-1640 培养基, 在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 0.25% 的胰酶消化传代。

1.3 总 RNA 的抽提及质量鉴定

用 mirVana™miRNA Isolation Kit 分别提取两组细胞的总 RNA。用分光光度计测定 260nm 和 280nm 的吸收值, 评估 RNA 的浓度和纯度。用 Agilent Bioanalyzer 2100 分析样品 RIN(RNA 分子完整性指数) 值评价总 RNA 质量。

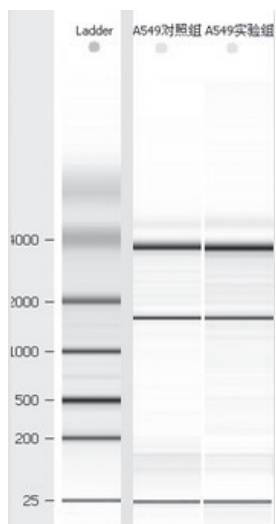
* 国家自然科学基金项目 (81071921); 国家 863 计划课题 (2011AA02A111); 湖北省卫生厅青年科技人才项目 (QJX2010-45); 武汉市“黄鹤英才计划”项目; 武汉市卫生系统科研项目 (WX11A03)。

卢忠心, 通讯作者, E-mail: lz71@yahoo.com。



注：波形图的横轴代表条带大小，纵轴代表信号强度

图1 总RNA质量分析



注：电泳图第一条 marker，2个样品在1~2kb的带是18s，4kb附近的是28s

图2 总RNA质量分析

1.4 荧光标记与 miRNA 芯片的杂交

将100ng的总RNA去磷酸，pCp—Cy3标记miRNA，然后与Agilent人类miRNA芯片55℃杂交20h。杂交后的芯片经清洗、扫描，图像由Feature Extraction 10.7软件提取，杂交信号以数据形式输出。

1.5 荧光定量 RT-PCR 验证

将1μg总RNA反转录为第一链cDNA，以第一链cDNA为模板进行PCR扩增，20μL的PCR反应体系如下：2×Mastermix(ABI公司)10μL，20×TaqMan®Small RNA Assay 1.00μL，cDNA1.33μL，加水至20μL，重复三孔。95℃变性10min，95℃是15s，60℃1min，40个循环。采用U6RNA作为内参，相对定量计算公式为 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 。

1.6 生物信息学预测靶基因

利用miRBase 19^[12]进行靶基因预测，此数据库提供了Tarbase、DIANA-microt、miRDB、miRanda (micromna.org)、RNA22、targetScan、PicTar等miRNA靶标预测软件的链接。

1.7 数据分析

采用Gene Spring Software 11.0对数据进行归一

化处理，样品杂交信号以2为底进行对数转换，筛选出倍数差异Fold change>2的microRNA。

2 结 果

(1) 总RNA提取质量检测结果：根据RNA在A260/A280 ≥ 1.8 来鉴定RNA的纯度，对照组和槐耳清膏处理组的RNA纯度分别是2.06和1.91，均符合要求。根据Agilent Bioanalyzer 2100分析样品RIN(RNA分子完整性指数)值 ≥ 7.0 和28S/18S ≥ 0.7 来鉴定RNA的完整性，对照组和药物处理组的RIN值分别是8.5和8.4，28S/18S值均为2.0，波形图和电泳图见图1、图2。

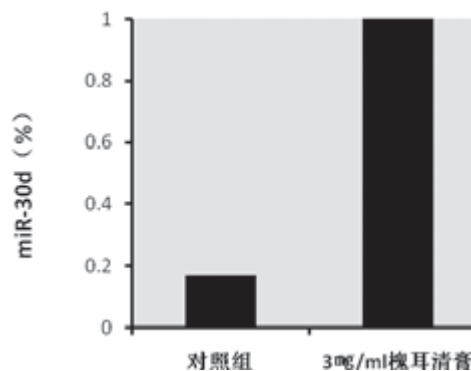


图3 槐耳清膏影响肺癌细胞A549中miR-30d的表达

(2) miRNA芯片检测结果：槐耳清膏处理组与对照组相比，有66个miRNAs变化倍数>2，上下调的miRNAs各有33个，部分差异表达miRNAs(见表1)。

(3) RT-PCR检测结果：根据相对定量计算公式，得出has-miR-30d的 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 值为5.78，与对照组相比差异具有统计学意义，说明槐耳清膏处理组较对照组表达上调5.78倍，表明结果与芯片结果相符(见图3)。

(4) 差异表达miRNA的靶基因预测结果：筛选出部分靶基因，显示其生物学功能与细胞增殖、凋亡、侵袭转移、血管生成密切相关。部分差异表达miRNA的靶基因预测结果(见表2)。

3 讨 论

肺癌是恶性肿瘤中最常见的致死性肿瘤，近年来肺

癌致死率呈增加趋势^[13]。miRNA 是近几年研究的明星分子。成熟的 miRNA 通过与靶 mRNA 的 3' -UTR 结合, 来抑制其翻译或促进其降解, 参与发育、炎症、肿瘤等多种生理病理过程。

表 1 槐耳清膏处理后差异表达的 miRNA

miRNA	Fold change	mirbase.accession	miRNA 家族
hsa-miR-150-3p	90.65	MIMAT0004610	hsa-miR-150
hsa-miR-192-5p	62.31	MIMAT0000222	hsa-miR-192
hsa-miR-132-3p	55.17	MIMAT0000426	hsa-miR-132
hsa-miR-134	38.81	MIMAT0000447	hsa-miR-134
hsa-miR-296-5p	37.37	MIMAT0000690	hsa-miR-296
hsa-miR-135a-3p	32.77	MIMAT0004595	hsa-miR-135
hsa-miR-26a-2-3p	19.40	MIMAT0004681	hsa-miR-26
hsa-miR-181b-5p	3.85	MIMAT0000257	hsa-miR-181
hsa-miR-762	3.18	MIMAT0010313	hsa-miR-762
hsa-miR-26b-5p	2.90	MIMAT0000083	hsa-miR-26
hsa-miR-181a-5p	2.46	MIMAT0000256	hsa-miR-181
hsa-miR-30d-5p	2.29	MIMAT0000245	hsa-miR-30
hsa-miR-19b-3p	-2.19	MIMAT0000074	hsa-miR-19
hsa-miR-582-5p	-2.20	MIMAT0003247	hsa-miR-582
hsa-miR-197-5p	-2.31	MIMAT0022691	hsa-miR-197
hsa-miR-19a-3p	-2.84	MIMAT0000073	hsa-miR-19
hsa-miR-494	-2.87	MIMAT0002816	hsa-miR-494
hsa-miR-766-3p	-4.22	MIMAT0003888	hsa-miR-766
hsa-miR-21-3p	-6.23	MIMAT0004494	hsa-miR-21
hsa-miR-29b-1-5p	-19.39	MIMAT0004514	hsa-miR-29
hsa-miR-125a-3p	-32.74	MIMAT0004514	hsa-miR-125
hsa-miR-337-3p	-38.44	MIMAT0000754	hsa-miR-337
hsa-let-7b-3p	-38.78	MIMAT0004482	hsa-let-7
hsa-miR-188-5p	-39.71	MIMAT0000457	hsa-miR-188
hsa-miR-18a-5p	-41.58	MIMAT0000072	hsa-miR-18
hsa-miR-191-3p	-58.23	MIMAT0001618	hsa-miR-191
hsa-miR-575	-70.88	MIMAT0003240	hsa-miR-575
hsa-miR-1305	-75.50	MIMAT0005893	hsa-miR-1305
hsa-miR-1281	-88.50	MIMAT0005939	hsa-miR-1281
hsa-miR-1304-3p	-93.74	MIMAT0022720	hsa-miR-1304
hsa-miR-503	-134.96	MIMAT0002874	hsa-miR-503

表 2 部分差异表达 miRNA 的靶基因预测结果

差异 miRNA	miRNA	靶基因
上调的 miRNA	hsa-miR-150-3p	MYB, NOTCH3, PIM1, MMP16, ZEB1
	hsa-miR-192-5p	RBI, RAB2, AVCR2B, TCF7, C1orf21
	hsa-miR-132-3p	RASA1, MMP16
	hsa-miR-134	K-RAS, SMAD6, RASA1, FOXM1, C5orf13
	hsa-miR-296-5p	HGS
	hsa-miR-135a-3p	RBAK, SMAD5, ERBB4, STAB2, PIM2, BCL11A, CDC40
	hsa-miR-181b-5p	BCL2, K-RAS, DAG1
下调的 miRNA	hsa-miR-30d-5p	BCL9, CCNE2, FOXA1, E2F7, JAG3, CHD9, NOTCH1, SATB1, MTDH
	hsa-miR-503	BIK, MACF1, SOCS6, MAP2K4, PDCD4, YOD1
	hsa-miR-575	FAT3, ST7L, TP53INP2, TRAF3
	hsa-miR-191-3p	SOX4, CDK6
	hsa-miR-18a-5p	BTG3, ATM, ESR1, PHF2
	hsa-miR-188-5p	SUZ12, SEK1L, ZFHX4
	hsa-let-7b-3p	TP53, YOD1, FAS, BTG2, TOB2, EZH2, MTUS1
	hsa-miR-125a-3p	BAK1, APC, TNFAIP3
hsa-miR-494	PTEN, BIM, IGF1R, CDK6, SMAD1, SOX1, EGR3, APC	

在对肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) 抵抗的神经胶质瘤细胞和肺癌细胞中, miR-30b/c 和 miR-21 表达增加, 进一步实验证实, 这两种 miRNA 扮演了癌基因的角色^[14]。在非小细胞型肺癌细胞 A549 中, miR-193b

表达降低, 而实验恢复 miR-193b 的表达则能有效抑制细胞增殖和侵袭转移, 提示 miR-193b 扮演了抑癌基因的角色^[15]。miRNA 表达谱与肿瘤的发生、发展密切相关, 有望成为肿瘤发生的早期诊断、预后判断以及靶向治疗的分子靶标。

中药抗肿瘤是在中医“扶正祛邪”用药理论指导下的临床用药, 注重整体, 攻补兼施, 副作用小, 能减轻病痛, 且效果稳定持久, 具有现代医学治疗肿瘤方法所不可比拟的独特优势。但是, 目前许多中药及其有效成分抗肿瘤机理尚不完全清楚, 其抗肿瘤机制的研究正日益受到重视。已有报道证明, 中药对肿瘤中异常表达的基因具有调控作用, 从而纠正其病理状态。最近研究发现, 姜黄素能通过下调 miRNA-186* 来促进肺腺癌细胞凋亡, 进一步研究表明, miRNA-186* 通过靶向抑制 Caspases 家族中的细胞凋亡启动者 Caspase-10 的表达, 从而抑制细胞凋亡^[16]。Seunghee 等^[17]利用基因芯片技术检测经白藜芦醇处理后, 肺腺癌细胞 A549 中 miRNA 表达谱的变化, 发现 71 种 miRNA 有明显的变化。在肺腺癌 A549 细胞中, miR-34c-5p 能够明显抑制紫杉醇诱导的细胞凋亡作用, 证实是通过调节靶基因 Bcl-2 修饰因子 Bmf, 最终负调控 p53 的表达进而产生耐药性^[18]。这些研究表明, miRNA 的异常表达参与了中药抗癌的过程。

金克槐耳颗粒是国家一类新药, 已应用于临床, 对肝癌、肺癌、食管癌、胃癌等均具有独特效果。本研究采用 miRNA 芯片技术, 初步筛选出槐耳清膏作用后, 肺癌细胞 miRNA 的差异表达谱, 并对差异表达的 miRNA 进行靶基因预测。我们发现, 表达上调的 miRNA 中, miR-150-3p、miR-132-3p、miR-134、miR-30d-5p, 其靶基因包括 MMP16、ZEB1、FOXM1、SATB1、MTDH, 这些基因与癌细胞的侵袭转移密切相关。Li 等^[19]的报道已经证实, 在非小细胞型肺癌中, miR-134 能通过靶向叉头蛋白 FOXM1 来抑制上皮间质转化。还有研究报道, miR-150 通过靶向抑制上皮间质转化的诱导蛋白 ZEB1, 发挥其

抑制肿瘤细胞侵袭转移的作用^[20]。表达上调的 miRNA 中, miR-192、miR-181a、miR-181b、miR-26b-5p、miR-135a、miR-296 等, 其靶基因包括 K-RAS、SMAD6、RASA1、RB1、RAB2、AVCR2B、TCF7、C1orf21、E2F7、JAG3、CHD9、NOTCH1、HGS 等, 这些靶基因密切参与细胞的增殖、凋亡或血管生成过程中。miR-503、miR-575、miR-125a、miR-18a、miR-188、miR-494 等均是槐耳清膏处理后表达下调的 miRNA, 它们的靶基因包括 BIK、MACF1、PDCD4、YOD1、TP53、FAS、BTG2、TOB2、EZH2、PTEN、BIM、IGF1R 等。有研究表明, miR-494 通过靶向作用于 PTEN 和 BIM, 来促进肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞凋亡^[21~22]。上述槐耳清膏处理后差异表达 miRNA 的发现, 以及它们靶基因的预测为槐耳清膏抗肿瘤机制的阐明提供了新的线索。建立在此基础上的关于 miRNA 的实验论证和功能学研究有待进一步开展, 在 miRNA 水平深入挖掘槐耳清膏的抗肿瘤作用意义重大。[CSTA

参考文献

- [1] LI L, YE S, WANG Y. Progress on Experimental Research and Clinical Application of Trametes Robiniophila [J]. *Bulletin of Chinese Cancer*, 2007, 2: 016.
- [2] 庄毅. 抗癌新药槐耳冲剂的研究 [J]. *中国药学杂志*. 1998, 33(5): 273-5.
- [3] Wang X, Zhang N, Huo Q, Yang Q. Anti-angiogenic and antitumor activities of Huaier aqueous extract[J]. *Oncology reports*, 2012, 28(4): 1167-75.
- [4] Zhang N, Kong X, Yan S, Yuan C, Yang Q. Huaier aqueous extract inhibits proliferation of breast cancer cells by inducing apoptosis[J]. *Cancer science*. 2010; 101(11): 2375-83.
- [5] 张芷旋, 范羽, 周清华, 等. 槐耳清膏对人高转移大细胞肺癌细胞 L9981 血管生成相关基因表达的影响 [J]. *中国肺癌杂志*. 2006, 9(2): 137-42.
- [6] Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe[J]. *Nat Rev Genet*. 2009, 10(2): 94-108.
- [7] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004, 116(2): 281-97.
- [8] Sreenivasan S, Thirumalai K, Danda R, et al. Effect of curcumin on miRNA expression in human Y79 retinoblastoma cells[J]. *Current eye research*. 2012, 37(5): 421-8.
- [9] Bae S, Lee EM, Cha HJ, et al. Resveratrol alters microRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells[J]. *Molecules and cells*. 2011, 32(3): 243-9.
- [10] Tong JL, Zhang CP, Nie F, et al. MicroRNA 506 regulates expression of PPAR alpha in hydroxycamptothecin resistant human colon cancer cells[J]. *FEBS Lett*. 2011, 585(22): 3560-8.
- [11] Catuogno S, Cerchia L, Romano G, et al. miR-34c may protect lung cancer cells from paclitaxel-induced apoptosis. *Oncogene*, 2012.
- [12] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(Database issue): D152-7.
- [13] Zeng HM, Zheng RS, Zhang SW, et al. [Trend analysis of cancer mortality in China between 1989 and 2008]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*, 2012, 34(7): 525-31.
- [14] Quintavalle C, Donnarumma E, Iaboni M, et al. Effect of miR-21 and miR-30b/c on TRAIL-induced apoptosis in glioma cells[J]. *Oncogene*. 2012. Epub 2012/09/12. doi: 10.1038/onc.2012.410. PubMed PMID: 22964638.
- [15] Hu H, Li S, Liu J, et al. MicroRNA-193b modulates proliferation, migration, and invasion of non-small cell lung cancer cells[J]. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 2012, 44(5): 424-30.
- [16] Zhang J, Du Y, Wu C. Curcumin promotes apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through miR-186* signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2010, 24 (5): 1217-1223.
- [17] Bae S, Lee EM, Cha HJ, et al. Resveratrol alters microRNA expression profiles in A549 human non-small cell lung cancer cells[J]. *Mol Cells*, 2011, 32(3), 243-249.
- [18] Catuogno S, Cerchia L, Romano G, et al. miR-34c may protect lung cancer cells from paclitaxel-induced apoptosis[J]. *Oncogene*, 2012.
- [19] Li J, Wang Y, Luo J, et al. miR-134 inhibits epithelial to mesenchymal transition by targeting FOXM1 in non-small cell lung cancer cells[J]. *FEBS Lett*, 2012; 586(20): 3761-5.
- [20] Yokobori T, Suzuki S, Tanaka N, et al. MiR-150 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma via targeting the EMT inducer ZEB1[J]. *Cancer science*. 2012.
- [21] Liu L, Jiang Y, Zhang H, et al. Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo(a)pyrene-trans-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. *Life sciences*, 2010, 86(5-6): 192-8.
- [22] Romano G, Acunzo M, Garofalo M, et al. MiR-494 is regulated by ERK1/2 and modulates TRAIL-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through BIM down-regulation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(41): 16570-5.