

中药研究

白花蛇舌草对大肠癌耐药细胞 microRNAs 表达的影响

林久茂^{1,2} 李琼瑜¹ 严兆坤¹ 赖子君¹ 靳祎祎¹ 彭 军^{1,2}

(1 福建中医药大学中西医结合研究院,福州,350122; 2 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室,福州,350122)

摘要 目的:探讨白花蛇舌草(Hedyotis Diffusa Wilid,HDW)对大肠癌 5-FU 耐药细胞 miRNAs 表达的调控作用,进一步揭示其逆转大肠癌多药耐药(Multidrug Resistance,MDR)作用机制。方法:通过体外培养 HCT-8/5-FU 细胞,经 HDW 处理,采用 MTT 检测细胞活力、倒置显微镜观察细胞形态、microRNA(miRNA)表达谱芯片分析、QPCR 验证差异 miRNA 表达、GO 及 Pathway 分析预测差异 miRNA 调控的信号通路。结果:HDW 可显著抑制大肠癌 HCT-8/5-FU 耐药细胞的活力,降低细胞密度;HDW 调控 57 个 miRNA 差异表达,其中上调 23 个,下调 34 个;QPCR 验证 HDW 上调 miR-92b-5p、miR-1247-3p、miR-4800-5p 的表达,下调 miR-4454、miR-4443、miR-483-5p 的表达;信号通路预测显示 HDW 可调控 PI3K/Akt、TGF- β /Smad、MAPK、P53、Wnt、JAK-STAT 等多条与细胞耐药、迁移、侵袭、增殖、凋亡有关的信号通路。结论:HDW 对大肠癌 5-FU 耐药细胞 HCT-8/5-FU 具有显著的抑制作用,通过调控 miRNAs 表达是其逆转大肠癌耐药的作用机制之一。

关键词 白花蛇舌草;大肠癌;microRNA;耐药

Effects of Herba Hedyotis Diffusae on Expression of microRNAs in Colorectal Cancer Drug Resistant CellsLin Jiumao^{1,2}, Li Qiongyu¹, Yan Zhaokun¹, Lai Zijun¹, Jin Yiyi¹, Peng Jun^{1,2}

(1 Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

2 Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, China)

Abstract Objective: To study the regulatory effect of Herba Hedyotis Diffusae on multidrug-resistance (MDR)-related microRNAs (miRNAs) in colorectal cancer, and further explore the underlying mechanisms of its MDR reversion. **Methods:** The signal pathway regulated by miRNA was forecasted by MTT assays, morphology observation, miRNA array analysis, QPCR validation, GO and Pathway analysis through treatment of HDW in HCT-8/5-FU cells. **Results:** HDW significantly inhibited colorectal cell viability and decreased density of HCT-8/5-FU cells. There were 23 up-regulated and 34 down-regulated in 57 miRNA differential expression after HDW treatment; and QPCR verification confirmed that HDW increased expression of miR-92b-5p, miR-1247-3p and miR-4800-5p and decreased expression of miR-4454, miR-4443, miR-483-5p; and the signal pathway prediction showed that HDW could control PI3K/Akt, TGF- β /Smad, MAPK, P53, Wnt and JAK-STAT signaling pathways regulating MDR, migration, invasion, proliferation and apoptosis. **Conclusion:** HDW can remarkably suppress proliferation in HCT-8/5-FU cells, and it is one of the mechanisms to reverse the drug resistance of colorectal cancer by regulating miRNAs expression.

Key Words Herba Hedyotis Diffusae; Colorectal cancer; microRNA; Drug resistance

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.11.052

大肠癌(Colorectal Cancer, CRC)是常见的消化道恶性肿瘤之一,据美国癌症协会调查研究报道,每年全球逾 60 万人死于 CRC,具有高发病率和死亡率,严重危害人类健康^[1]。化疗是治疗 CRC 术后复发及失去手术机会或转移性 CRC 的主要手段。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是临床上肠癌化疗的基础用药,常导致 CRC 细胞产生 5-FU 耐药性,进而产生继发性多药耐药,是导致 5-FU 治疗失败的主要因素。肿瘤细胞 MDR 产生的机制非常复杂,与细胞

内药物的蓄积、药物在细胞的分布及 MDR 基因过表达密切相关,越来越多的研究表明肿瘤耐药与细胞相关蛋白及信号通路有关,并受到相关信号通路的调控。microRNA(miRNA)表观遗传学调控与肿瘤 MDR 密切相关^[2]。miRNA 是一类分布广泛的由约 19~24 个核苷酸组成的一类内源性非编码(Non-protein-coding)单链 RNA^[3]。miRNA 在转录后水平通过结合和降解耐药相关靶基因的 mRNA 抑制其翻译,从而在肿瘤的耐药中也扮演了重要的角

基金项目:教育部博士点基金博导类项目(20133519110003);陈可冀中西医结合发展基金项目(CKJ2015007, CKJ2014013)

作者简介:林久茂(1975.02—),男,博士,副研究员,研究方向:中西医结合抗肿瘤机制研究, E-mail:jiuamolin@hotmail.com

通信作者:彭军(1969.11—),男,博士,研究员,研究方向:生化与分子生物学, E-mail:pjunlab@hotmail.com

色^[4]。

白花蛇舌草 (*Hedyotis Diffusa* Willd, HDW) 性寒,味甘苦,归心、肝、大肠经,具有清热解毒、消痈散结的功效^[5]。白花蛇舌草广泛应用于中医临床抗 CRC 的治疗,具有显著疗效。研究表明白花蛇舌草对多种恶性肿瘤疗效确切^[6-8],前期证实白花蛇舌草可通过多条途径诱导 CRC 细胞凋亡^[9]、抑制 CRC 细胞增殖^[10-12]、抑制 CRC 血管新生^[13]、逆转 CRC MDR 的作用^[14]。但白花蛇舌草逆转肿瘤 MDR 的作用机制仍为阐明。为进一步揭示白花蛇舌草的作用机制,对其干预 CRC 5-FU 耐药细胞后的 miRNAs 表达进行芯片筛选,并结合生物信息学方法分析归纳,以期为其调控 miRNA 抑制 CRC 耐药细胞生长提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 CRC 耐药细胞 HCT-8/5-FU (南京凯基生物科技发展有限公司);HDW (福建中医药大学附属第三人民医院)。

1.1.2 试剂与仪器 无水乙醇 (天津福晨化学工业有限公司生产);RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (FBS)、胰酶、磷酸盐缓冲液 (PBS, 美国 Hyclone 公司);RNAiso Plus、SYBR PrimeScript miRNA RT-PCR 试剂盒 (中国宝生物工程有限公司生产);酶标仪 (ELX800, 美国 BioTek 公司);超微量核酸分析仪 (ND-2000C, 美国 Thermo 公司);实时荧光定量 PCR 仪 (7500 Fast, 美国 life 公司);倒置显微镜 (DMI4000B, 德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HDW 提取物的制备 HDW (0.1 kg) 用 85% 乙醇 1 L 回流提取 2 次,合并后过滤,浓缩滤液,真空干燥成粉末。HDW 提取物粉末用 PBS 配制 200 mg/mL 溶液, -20 °C 贮存备用。用前采用直径 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

1.2.2 细胞培养 HCT-8/5-FU 细胞用含 5FU (15 μg/mL) 的 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液置于 37 °C 二氧化碳培养箱中培养。细胞生长汇合度达 90% 后,去除培养液加入 0.25% 含 EDTA 胰酶进行消化,细胞变圆脱落后加入 5 倍胰酶体积的完全培养液终止消化,收集单细胞悬液于离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,HCT-8/5-FU 细胞细胞用 RPMI-1640 完全培养液重悬后进行传代或接种。

1.2.3 细胞活力分析 取对数生长期 HCT-8/5-FU 消化计数,按 1.0×10^5 个/mL 接种于 96 孔培养板

中,100 μL/孔。细胞生长至 50% ~ 60% 时加入终浓度为 0.5 ~ 2.0 mg/mL HDW,对照组加等体积的 PBS。HDW 干预 24 h 后,每孔加入 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液 100 μL,37 °C 孵育 4 h,吸弃 MTT,每孔加入 DMSO 100 μL,室温振荡混匀后,ELX800 酶标仪 (波长 570 nm) 测定各孔吸光度值 (即 A 值),细胞活力 (%) = (HDW 干预组 A 值/对照组 A 值) × 100%;细胞抑制率 (%) = 对照组细胞活力 - 药物组细胞活力。

1.2.4 细胞形态学观察 取对数期生长的 HCT-8/5Fu 消化计数,按 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔培养板中,细胞生长至 50% ~ 60% 时加入终浓度为 0.5 ~ 2.0 mg/mL HDW。以不加药细胞作为对照组 (加等体积的 PBS),用 DMI4000B 倒置显微镜进行细胞形态的观察并拍照。

1.2.5 miRNA 芯片分析 取对数生长期 HCT-8/5Fu 细胞,按照 1.0×10^6 /孔的密度接种于 6 孔板中。分为对照组和 HDW 干预组 (1.0 mg/mL),细胞经药物干预 24 h 后,弃上清,用 PBS 清洗,每孔加 RNAiso Plus 1 mL 提取总小 RNA,ND-2000 C 超微量核酸分析仪测定 RNA 浓度和纯度并芯片分析。本文选取上海欣景公司的 miRNA 表达谱芯片进行实验。芯片探针版本为 HmiOA 4.1,Human miRNA 探针有 1 087 条,共涵盖人源相关 miRNA 基因 1090 个。

1.2.6 定量 PCR (Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction, QPCR) 验证 取对数生长期的 HCT-8/5-FU 细胞,以 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔培养板,2 mL/孔,培养过夜后加入终浓度 0.5 mg/mL HDW 干预 24 h。按上述方法进行 miRNA 提取。取 500 ng RNA 进行 Poly (A) 加尾反应。混匀后,37 °C 60 min,85 °C 5 s。向反应液中添加无 RNA 酶的去离子水至 100 μL。QPCR 反应体系 20 μL,即: cDNA 溶液 2 μL,SYBR Premix Ex Taq II (2 ×) 10 μL,PCR Forward Primer (10 μM) 0.8 μL,Uni-miR qPCR Primer (10 μM) 0.8 μL,ROX Reference Dye II (50 ×) 0.4 μL,6 μL dH₂O。引物: miR-92b-5p、miR-1247-3p、miR-4800-5p、miR-4454、miR-4443、miR-483-5p、U6 由引物由中国宝生物工程 (大连) 有限公司提供。混匀后,于 7500Fast QPCR 仪进行 miRNA 表达分析。

1.2.7 Gene Ontology (GO) 及 pathway 分析 采用 Cytoscape 及其插件 BINGO (<http://www.Cytoscape.Org/>) 对 miRNA 靶基因进行 GO 分析。GO 分析包

括了基因参与的生物过程 (Biological Process)、发挥的分子功能 (Molecular Function)、所处的细胞位置 (Cellular Component) 等 3 个方面的功能信息,并用 BiNGO 进行 GO 显著性分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。将靶基因向 KEGG pathway 数据库映射,使用分析软件 DAVID 进行分析并根据统计检验方法 (P -value) 选显著富集的分类。通过 Fisher Exact Test 计算分析表达差异 miRNAs 调控的信号转导通路。

1.3 统计学方法 用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行统计学分析,数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,2 组数据之间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HDW 对 CRC 耐药细胞 HCT-8/5FU 生长的影响 HDW 对人结肠癌 5-FU 耐药细胞 HCT-8/5-FU 生长具有显著的抑制作用。随 HDW 浓度的增加, HCT-8/5-FU 细胞的活力逐渐降低,细胞的生长受到抑制,呈剂量依赖效应。与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 HDW 对 HCT-8/5-FU 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	细胞活力	抑制率
HDW-0 mg/mL 组 ($n = 8$)	100 $\pm$ 8.06	0
HDW-0.5 mg/mL 组 ($n = 8$)	81.57 $\pm$ 5.19 *	18.43
HDW-1.0 mg/mL 组 ($n = 8$)	74.17 $\pm$ 6.24 *	25.83
HDW-1.5 mg/mL 组 ($n = 8$)	53.17 $\pm$ 8.05 *	46.83
HDW-2.0 mg/mL 组 ($n = 8$)	34.21 $\pm$ 3.261 *	65.79

注:与 HDW-0 mg/mL 组比较, * $P < 0.05$

2.2 HDW 对 CRC 耐药细胞 HCT-8/5-FU 形态的影响 HCT-8/5-FU 细胞经不同浓度 HDW 干预后,与对照组比较,HCT-8/5-FU 细胞密度具有不同程度减少。当 EEHDW 浓度达到 1 mg/mL 时,HCT-8/5-FU 细胞密度明显减少,细胞形态发生改变,出现一些漂浮的脱落细胞;当 EEHDW 浓度达到 2 mg/mL 时,细胞密度进一步减少,细胞变圆、变小,大部分细胞脱落死亡。该结果进一步表明了 HDW 可显著抑制 CRC 耐药细胞 HCT-8/5-FU 的生长,呈明显的剂量效应。见图 1。

2.3 HDW 对 CRC 耐药细胞 HCT-8/5-FU miRNA 表达的影响 miRNAs 表达谱芯片分析,结果发现 HDW 对 CRC 耐药细胞 HCT-8/5-FU 的 miRNA 表达具有调控作用,共有 57 个 miRNA 发生了显著的表达变化,HDW 上调 23 个 miRNA 表达,下调 34 个 miRNA 表达。进一步采用 QPCR 验证,结果证实 HDW 上调 miR-92b-5p、miR-1247-3p、miR-4800-5p

等表达,下调 miR-4454、miR-4443、miR-483-5p 等表达,与芯片结果相符。见图 2。

2.4 通路分析预测结果 采用 miRNA 靶基因数据库进行 miRNA 靶基因预测,结果显示,预测的靶基因有 1 775 个(略)。针对以上 1775 个靶基因,将其分别投射至 GO 的 3 个功能上,结果显示预测的靶基因分别富集于肿瘤细胞耐药、迁移、侵袭、增殖、凋亡有关的信号通路。在此基础上,进一步对基因进行细胞信号通路富集分析。HCT-8/5-FU 细胞经 HDW 处理前后结果显示,在经典通路数据库 KEGG 中 miRNA 显著富集于 PI3K/Akt 通路、TGF- β /Smad 通路、MAPK 通路、P53 通路、Wnt 通路、JAK-STAT 通路等许多重要的生物途径包括细胞耐药、迁移、侵袭、增殖、凋亡等,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

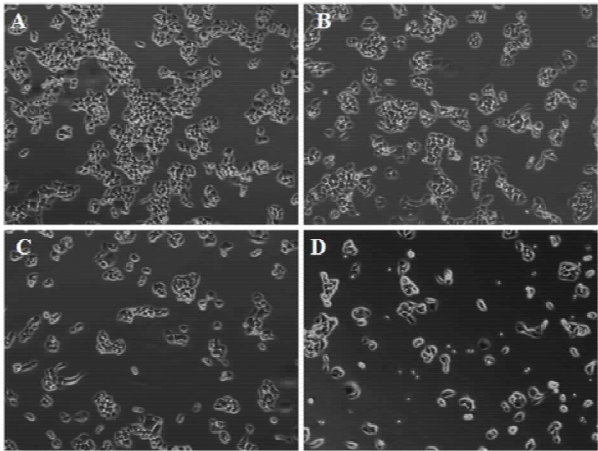


图 1 HDW 对 HCT-8/5Fu 细胞形态的影响

注: A. HDW-0 mg/mL 组; B. HDW-0.5 mg/mL 组; C. HDW-1.0 mg/mL 组; D. HDW-2.0 mg/mL 组

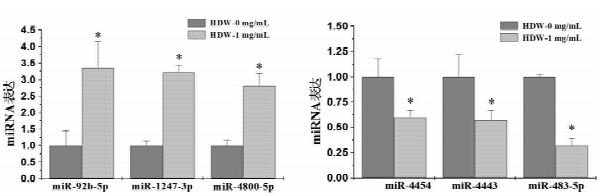


图 2 QPCR 验证 HDW 对 HCT-8/5FU 细胞 miRNA 表达的影响

注:与 HDW-0 mg/mL 组比较, * $P < 0.05$

表 2 miRNA 预测靶基因的通路富集分析

基因数量	信号通路	P
421	Genes involved in Cell Cycle	1.83E-06
267	MAPK signaling pathway	2.75E-11
155	Jak-STAT signaling pathway	1.77E-07
137	Direct p53 effectors	3.99E-07
421	Genes involved in Cell Cycle	1.83E-06
66	HIF-1-alpha transcription factor network	1.38E-06

3 讨论

肿瘤细胞 MDR 产生涉及到多条信号通路的异常激活,以及下游耐药基因、药物代谢酶以及凋亡调控因子的表达异常。近年来的研究表明 miRNA 等表观遗传学调控机制在 MDR 相关信号通路活化及相关基因表达的调控中发挥了重要作用^[15-16]。前期实验中,也发现 HDW 可以增加 CRC HCT-8/5-FU 细胞对 5FU 的敏感性,通过下调 ABC 转运蛋白家族成员 ABCG2,从而增加 5-FU 的蓄积^[14],然而具体的机制尚未完全阐明。为了进一步揭示 HDW 抑制耐药 CRC 细胞生长的机制,首先通过 MTT 实验观察 HDW 对 HCT-8/5-FU 耐药细胞活力的影响,结果表明 HDW 对 HCT-8/5-FU 细胞具有显著抑制作用;并从 miRNA 表观遗传学调控进一步探讨 HDW 抑制 CRC 耐药细胞的作用机制,采用 miRNA 表达谱芯片分析,结果发现 HDW 对 HCT-8/5-FU 细胞的 miRNA 表达具有显著的调控作用。为进一步验证 miRNA 表达谱芯片结果的正确性和可靠性,对部分差异表达的 miRNAs (miR-92b-5p、miR-1247-3p、miR-4800-5p、miR-4454、miR-4443、miR-483-5p)进行 Q-PCR 验证,结果表明 HDW 对 miRNAs 表达的调控与芯片结果相一致。通过生物信息学的方法,利用靶基因预测软件对 miRNA 靶基因进行分析,并进一步结合 GO 分析和 Pathway 分析,发现 HDW 对 HCT-8/5FU 细胞包括 PI3K/Akt、TGF- β /Smad、MAPK、p53、Wnt 和 JAK-STAT 等许多重要的细胞信号转导通路均有调控作用,涉及细胞的耐药、迁移、侵袭、增殖、凋亡等多个方面,提示 HDW 可通过多靶点、多途径、多环节发挥其抑制 CRC 作用及逆转 CRC 耐药作用。

总之,本文证实了 HDW 能通过抑制 CRC 耐药细胞 HCT-8/5-FU 的活力发挥抑制细胞增殖的作用;HDW 对 CRC 耐药细胞 HCT-8/5-FU 的 miRNAs 表达具有显著的调控作用,提示 HDW 通过调控 miRNA 表达对其相关信号通路发挥调控作用,进一步为临床应用 HDW 治疗 CRC 提供依据。但本研究涉及 HDW 调控耐药细胞的 miRNAs 为首次报道,其与药物敏感性的相关性还有待进一步深入探讨。

参考文献

- [1] Siegel R, Miller K, Ahmedin Jemal DVM. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] Magee P, Shi L, Garofalo M. Role of microRNAs in chemoresistance [J]. Ann Transl Med, 2015, 3(21): 332.

- [3] Dehghanzadeh R, Jadidi-Niaragh F, Gharibi T, et al. MicroRNA-induced drug resistance in gastric cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2015, 74(8): 191-199.
- [4] Acunzo M, Romano G, Wernicke D, et al. MicroRNA and cancer-a brief overview [J]. Adv Biol Regul, 2015, 57(1): 1-9.
- [5] Chen R, He J, Tong X, et al. The hedyotis diffusa willd. (Rubiaceae): a review on phytochemistry, pharmacology, quality control and pharmacokinetics [J]. Molecules, 2016, 21(6): 710.
- [6] Li YL, Zhang J, Min D, et al. Anticancer effects of 1, 3-Dihydroxy-2-methylantraquinone and the ethyl acetate fraction of hedyotis diffusa willd against HepG2 carcinoma cells mediated via apoptosis [J]. Plos One, 2016, 11(4): e0151502.
- [7] Zhang Y, Xie RF, Xiao QG, et al. Hedyotis diffusa willd extract inhibits the growth of human glioblastoma cells by inducing mitochondrial apoptosis via AKT/ERK pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 158(12): 404-411.
- [8] Wang N, Li DY, Niu HY, et al. 2-hydroxy-3-methylantraquinone from hedyotis diffusa willd induces apoptosis in human leukemic U937 cells through modulation of MAPK pathways [J]. Arch Pharm Res, 2013, 36(6): 752-758.
- [9] Lin JM, Chen YQ, Wei LH, et al. Hedyotis diffusa willd extract induces apoptosis via activation of the mitochondrion-dependent pathway in human colon carcinoma cells [J]. Int J Oncol, 2010, 37(5): 1331-1338.
- [10] Cai QY, Lin JM, Wei LH, et al. Hedyotis diffusa willd inhibits colorectal cancer growth in Vivo via inhibition of STAT3 signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(5): 6117-6128.
- [11] Lin MH, Lin JM, Wei LH, et al. Hedyotis diffusa willd extract inhibits HT29 cell proliferation via cell cycle arrest [J]. Exp Ther Med, 2012, 4(2): 307-310.
- [12] Lin JM, Wei LH, Xu W, et al. Effect of hedyotis diffusa willd extract on tumor angiogenesis [J]. Mol Med Rep, 2011, 4(6): 1283-1288.
- [13] Lin JM, Wei LH, Shen AL, et al. Hedyotis diffusa willd extract suppresses sonic hedgehog signaling leading to the inhibition of colorectal cancer angiogenesis [J]. Int J Oncol, 2013, 42(2): 651-656.
- [14] Li Q, Wang X, Shen A, et al. Hedyotis diffusa willd overcomes 5-fluorouracil resistance in human colorectal cancer HCT-8/5-FU cells by downregulating the expression of P-glycoprotein and ATP-binding cassette subfamily G member 2 [J]. Exp Ther Med, 2015, 10(5): 1845-1850.
- [15] Li Q, Liang X, Wang Y, et al. miR-139-5p inhibits the epithelial-mesenchymal transition and enhances the chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating BCL2 [J]. Sci Rep, 2016, 6(5): 27157.
- [16] Luo W, Lin Y, Meng S, et al. miRNA-296-3p modulates chemosensitivity of lung cancer cells by targeting CX3CR1 [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(4): 1848-1856.

(2016-08-10 收稿 责任编辑: 张文婷)