

# microRNA-29c在雷公藤内酯醇抗克唑替尼耐药H3122肺癌细胞增殖的作用及机制研究

周小芸 龚柳 潘虹 方勇

**[摘要]** 目的 探讨microRNA-29c在雷公藤内酯醇(TP)抗克唑替尼耐药肺癌细胞增殖的作用及机制研究。方法 将克唑替尼耐药H3122分为miRNA-29c inhibitor+ TP组、阴性对照miRNA(miRNA-NC)+ TP组、TP组和对照组。采用MTT检测细胞存活率,AnnexinV-FITC试剂盒检测细胞凋亡,Western blot法检测Bax、Bcl-2、cleaved-caspase3、DNMT3a表达,RT-qPCR检测DNA甲基转移酶3(DNMT3) mRNA、miRNA-29c表达,定量甲基化特异性PCR(QM-SP)法检测视黄酸受体(RARb)、RAS域家族蛋白1(RASSF1)、死亡相关蛋白激酶1(DAPK1)和p16 mRNA表达和甲基化状态。结果 与对照组比较,TP组中,TP浓度为10 nmol/L、25 nmol/L和50 nmol/L时,miRNA-29c表达增加( $t$ 分别=43.12、61.65、83.50,  $P$ 均 $<0.05$ ),DNMT3a表达下降( $t$ 分别=146.56、628.05、653.16,  $P$ 均 $<0.05$ )。与对照组比较,TP组细胞存活率、p16、RASSF1、DAPK1、RARb甲基化降低( $t$ 分别=14.76、94.52、103.08、67.15、72.22,  $P$ 均 $<0.05$ )、细胞凋亡率增加( $t=-9.32$ ,  $P<0.05$ ),Western blot结果显示DNMT3a、Bcl-2表达明显降低,Bax、cleaved-caspase3表达明显增高。与miRNA-NC+ TP组比较,miRNA-29c inhibitor+ TP组细胞存活率、p16、RASSF1、DAPK1、RARb甲基化明显增加( $t$ 分别=-4.08、-7.77、-67.84、-59.66、-46.79,  $P$ 均 $<0.05$ ),细胞凋亡率明显下降( $t=5.40$ ,  $P<0.05$ )。Western blot结果显示DNMT3a、Bcl-2表达明显增加,Bax、cleaved-caspase3表达明显降低。结论 TP能够增加miRNA-29c表达,下调DNMT3表达和活性,降低抑癌基因的甲基化水平,抑制H3122CR细胞增殖,发挥抗肺癌作用。

**[关键词]** 雷公藤内酯醇; microRNA-29c; DNA甲基化转移酶3 a; 甲基化; 细胞增殖

**Effect of microRNA-29c on proliferation inhibition induced by triptolide in crizotinib resistant H3122 NSCLC cells and its mechanism** ZHOU Xiaoyun, GONG Liu, PAN Hong, et al. Department of Medical Oncology, Sir Run Run Shaw Hospital, Xiasha Campus, Hangzhou 310018, China.

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of microRNA-29c in proliferation inhibition induced by triptolide (TP) in crizotinib resistant H3122 non-small cell lung cancer (NSCLC) cells and its mechanism. **Methods** The H3122 cells were divided into four groups: miRNA-29c inhibitor +TP group, miRNA negative control (NC) +TP group, TP group and control group. The cell survival rate was detected by MTT. The apoptosis was detected by AnnexinV/PI. Western blot was used to detect the expression of Bax, Bcl-2, cleaved-caspase3 and DNMT3a. The expression of DNMT3a mRNA and microRNA-29c were detected by RT-qPCR. The methylation of RARb, RASSF1, DAPK1 and p16 were detected by quantitative methylation-specific PCR (QMSP). **Results** Compared with control group, the expression of microRNA-29c increased in TP group when the concentration of TP was 10 nmol/L, 25 nmol/L and 50 nmol/L ( $t=43.12, 61.65, 83.50, P<0.05$ ), while the DNMT3a expression decreased ( $t=146.56, 628.05, 653.16, P<0.05$ ). Compared with control group, the cell survival rate, methylation of p16, RASSF1, DAPK1, RARb decreased ( $t=14.76, 94.52, 103.08, 67.15, 72.22, P<0.05$ ), while the apoptosis rate increased in TP group ( $t=-9.32, P<0.05$ ). Western blot result showed that DNMT3a and Bcl-2 expressions decreased, Bax and cleaved-caspase3 expressions increased in TP group. Compared with miRNA-NC+TP group, the cell survival rate, methylation of p16, RASSF1, DAPK1,

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2019.05.003

基金项目:浙江省自然科学基金(LQ16H160003)

作者单位:310018 浙江杭州,浙江大学医学院附属邵逸夫医学下沙院区肿瘤内科(周小芸、龚柳、潘虹);浙江大学医学院附属邵逸夫医院肿瘤内科(方勇)

通讯作者:方勇, Email:fangyong@zju.edu.cn

and RARb increased in miRNA-29c inhibitor+ TP group ( $t = -4.08, -7.77, -67.84, -59.66, -46.79, P < 0.05$ ), but the apoptosis rate decreased ( $t = 5.40, P < 0.05$ ). Western blot result showed that DNMT3a, Bcl-2 expression increased, Bax and cleaved-caspase3 expression decreased in the microRNA-29c inhibitor +TP group. **Conclusion** TP inhibits the proliferation of H3122CR cells via up-regulating the expression of microRNA-29c and down-regulating the expression and activity of DNMT3, resulting in tumor suppressor gene methylation.

**[Key words]** triptolide; microRNA-29c; DNA methyltransferase 3a; methylation; proliferation

肺癌是最常见的恶性肿瘤;非小细胞肺癌约占肺癌的 85%,5年生存率为 17.1%,严重威胁人类健康<sup>[1-3]</sup>。临床研究表明克唑替尼能使间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)阳性的非小细胞肺癌患者临床获益,但因获得性耐药而限制了其临床应用<sup>[4]</sup>。研究表明雷公藤内酯醇(triptolide, TP)能够显著抑制肺癌细胞增殖和肿瘤生长,并增加肿瘤耐药敏感性<sup>[5]</sup>;然而其在抗克唑替尼耐药的细胞的作用及机制仍未完全明确。因此,本次研究旨在研究 TP 对克唑替尼耐药细胞的影响及其机制。现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 H3122CR 细胞建立** 本次研究由浙江大学医学院附属邵逸夫医院在 2017 年 12 月至 2019 年 1 月完成。将人 H3122 细胞(中国科学院细胞库)培养种植于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素的杜尔贝科改良伊格格培养基,取对数生长细胞进行实验。采用浓度递增法,使 H3122 能在含有 1 μmol/L 的克唑替尼培养基中稳定增殖,建立 H3122 获得耐药细胞系(H3122CR)。

**1.2 分组** 将 H3122CR 分为 miRNA-29c inhibitor+ TP 组、阴性对照 miRNA(miRNA-NC)+ TP 组、TP 组和对对照组。其中 miRNA-NC 和 miRNA-29c inhibitor+ TP 分别用 100 nmol/L 的 inhibitor NC 和 miRNA-29c inhibitor(由锐博生物生产)转染 24 h 后,加入 50 nmol/L TP 处理,TP 组仅用 50 nmol/L TP 处理,对照组以等量的 0.9% 氯化钠溶液处理。

**1.3 细胞活性检测** 将  $1 \times 10^5$  个 H3122CR 细胞接种于 96 孔板中,按照分组方法处理,并继续培养 48 h 后,每孔加入 20 μl MTT,37 °C 恒温箱孵育 4 h,弃去上清液,加入二甲亚砜 120 μl 终止反应。酶标仪中检测各孔的吸光光度(A)值,计算细胞存活率。细胞存活率=实验组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

**1.4 细胞凋亡检测** 取  $2 \times 10^5$  个细胞接种至 6 孔板中,经处理 48 h 后,收集细胞悬液,以 1 500 r/min 离心,弃上清,再次重悬、离心、弃上清后,加入 500 μl 缓

冲液,吹散细胞。将 5 μl Annexin V-FITC、5 μl PI 依次加入、混匀,室温下避光孵育 15 min,上机检测。

**1.5 蛋白免疫印迹法** 各组细胞用预冷 PBS 漂洗 3 次后,加入 150 μl RIPA 细胞裂解液,冰上裂解 15 min,EP 管收集细胞裂解液,置于 4 °C 离心机,12 000 r/min 离心 15 min,取上清。按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量,取 20 μg 总蛋白用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离,电转至 PVDF 膜上;经 3% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入适量比例的抗 Bax、Bcl-2、cleaved-caspase3、DNA 甲基转移酶 3(DNA methyltransferase3, DNMT3)一抗,置于 4 °C 冰箱过夜。用 PBST 缓冲液洗膜后,按 1:20000 加入 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h。再次洗膜后,用 ECL 试剂显影。

**1.6 RT-qPCR** 总 RNA 用 Trizol 试剂(由 invitrogen 公司生产)抽提,即加入 1 ml Trizol 试剂吹下细胞,加入 200 μl 氯仿,EP 管内静置 15 min 后,置于 4 °C 离心机,12 000 r/min 离心 15 min。取上清,用 1 ml 75% 乙醇洗涤,再次离心,弃上清、干燥后,取 RNA 沉淀物。按照 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit 试剂盒(由 Applied Biosystems 公司生产)说明书进行操作。mRNA 逆转录反应,按照 Prime-Script RT Master Mix(由 Takara 公司生产)说明书合成 cDNA。将反转录物用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒(由 Takara 公司生产)在 ABI 7500 PCR 仪上进行 real time-PCR 扩增、检测。使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析 DNMT3a mRNA 表达情况。

**1.7 定量甲基化特异性 PCR** 按照 DNA 甲基化试剂盒说明书,提取 DNA。并配制 20 μl 的反应体系,包括 1 $\times$ TaqMan 混合液、探针(浓度为 250 nmol/L)、适量的引物和 2 μl DNA 样品。在 ABI 7500 定量 PCR 仪上扩增,扩增条件为:95 °C 预变性 10 min,95 °C 15 s,58 °C ~ 65 °C 60 s,50 个循环,以 0.5% 标准甲基化稀释液作为校正。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算样本表达量,其中  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{样本}} - \Delta Ct_{\text{校正}}$ ,  $\Delta Ct_{\text{样本}} = Ct_{\text{样本}} - Ct_{\text{ACTB}}$ 。

1.8 统计学方法 采用SPSS 23.0软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。计量资料比较采用独立样本 *t* 检验和LSD-*t* 检验。设  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 TP对H3122CR细胞内miRNA-29c和DNMT3a表达的影响见图1和表1

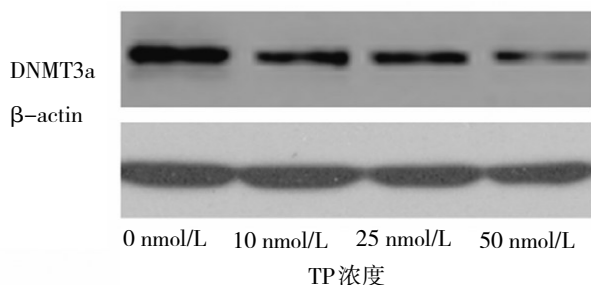


图1 TP对miRNA-29c和DNMT3a表达的影响

由图1可见,Western blot结果显示,10 nmol/L、25 nmol/L和50 nmol/L TP处理后, DNMT3a蛋白表达逐渐下降。

表1 TP对miRNA-29c和DNMT3a表达的影响

TP浓度	miRNA-29c	DNMT3a mRNA
0	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.01
10 nmol/L	1.98 ± 0.55*	0.68 ± 0.04*
25 nmol/L	2.86 ± 0.77 *	0.45 ± 0.06*
50 nmol/L	3.78 ± 0.86*	0.22 ± 0.01*

注:TP浓度为0 nmol/L为对照组,\*:与对照组比较, $P < 0.05$ 。

由表1可见,与对照组比较,10 nmol/L、25 nmol/L和50 nmol/L TP处理后,H3122CR细胞内miRNA-29c表达增加( $t$ 分别=43.12、61.65、83.50,  $P$ 均 $< 0.05$ ), DNMT3a mRNA表达逐渐下降( $t$ 分别=146.56、628.05、653.16,  $P$ 均 $< 0.05$ )。

2.2 TP通过miRNA-29c抑制H3122CR细胞增殖见图2和表2

由图2可见,Western blot结果显示,与对照组比较,TP组 DNMT3a、Bcl-2 表达明显降低, Bax、

cleaved-caspase3 表达明显增加。与TP组比较,miRNA-NC+ TP组 DNMT3a、Bcl-2 表达无明显增加, Bax、cleaved-caspase3 表达无明显降低。与miRNA-NC+ TP组比较,miRNA-29c inhibitor+ TP组 DNMT3a、Bcl-2 表达明显增加, Bax、cleaved-caspase3 表达明显降低。

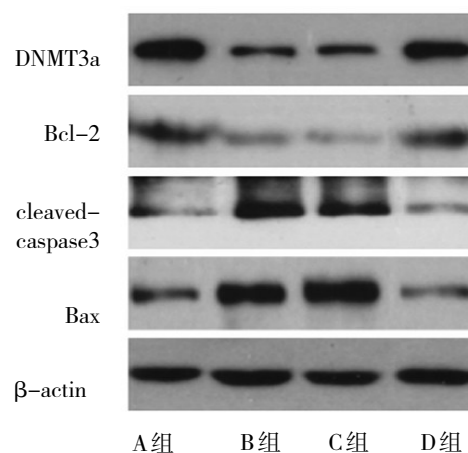


图2 miRNA-29c在TP抑制细胞增殖的作用

注:A组为对照组,B组为TP组,C组为miRNA-NC+TP组,D组为miRNA-29c inhibitor+TP组。

表2 miRNA-29c在TP抑制细胞增殖的作用/%

组别	细胞存活率	细胞凋亡率
miRNA-29c inhibitor +TP组	88.37 ± 8.12 <sup>#</sup>	8.63 ± 2.62 <sup>#</sup>
miRNA-NC+TP组	48.24 ± 9.01	28.36 ± 6.79
TP组	42.12 ± 10.10 *	30.31 ± 5.96 *
对照组	100.00 ± 2.00	3.62 ± 1.24

注: \*:与对照组比较, $P < 0.05$ ; #:与miRNA-NC+TP组比较, $P < 0.05$ 。

由表2可见,与对照组比较,TP组细胞存活率下降( $t=14.76$ ,  $P < 0.05$ ),细胞凋亡率增加( $t=-9.32$ ,  $P < 0.05$ ),与miRNA-NC+ TP组比较,miRNA-29c inhibitor+ TP组细胞存活率增加( $t=-4.08$ ,  $P < 0.05$ ),细胞凋亡率明显降低( $t=5.40$ ,  $P < 0.05$ )。

2.3 TP过miRNA-29c调控抑癌基因去甲基化见表3

表3 miRNA-29c在TP抑制抑癌基因甲基化的作用

组别	p16	RASSF1	DAPK1	RARb
miRNA-29c inhibitor +TP组	0.85 ± 0.10 <sup>#</sup>	0.84 ± 0.11 <sup>#</sup>	0.87 ± 0.11 <sup>#</sup>	0.82 ± 0.10 <sup>#</sup>
miRNA-NC+TP组	0.28 ± 0.09	0.35 ± 0.07	0.41 ± 0.09	0.33 ± 0.08
TP组	0.32 ± 0.01*	0.39 ± 0.12*	0.42 ± 0.10*	0.37 ± 0.08*
对照组	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.00

注: \*:与对照组比较, $P < 0.05$ ; #:与miRNA-NC+TP组比较, $P < 0.05$ 。

由表3可见,与对照组比较,TP组p16、RASSF1、DAPK1、RARb基因甲基化水平降低,差异均有统计学意义( $t$ 分别=94.52、103.08、67.15、72.22,  $P$ 均 $<0.05$ )。与TP组比较,miRNA-NC+TP组p16、RASSF1、DAPK1、RARb基因甲基化无明显变化( $t$ 分别=1.56、3.59、1.42、3.26,  $P$ 均 $>0.05$ )。与miRNA-NC+TP组比较,miRNA-29c inhibitor+TP组p16、RASSF1、DAPK1、RARb基因甲基化增加,差异均有统计学意义( $t$ 分别=-7.77、-67.84、-59.66、-46.79,  $P$ 均 $<0.05$ )。

### 3 讨论

DNMT3是DNA甲基化的关键酶,包括DNMT3a、DNMT3b和DNMT3L三种亚型,能够诱导的RARb、DAPK、RAS域家族蛋白1、p16等基因甲基化<sup>[6]</sup>。研究表明DNMT3a高表达于非小细胞肺癌组织中,与肺癌不良预后相关<sup>[7]</sup>。本次研究结果发现TP显著抑H3122CR细胞DNMT3表达和p16、RASSF1、DAPK1、RARb甲基化水平( $P$ 均 $<0.05$ ),提示TP具有显著抑制H3122CR细胞甲基化的作用。本次研究还发现TP处理后,H3122CR细胞存活率明显降低、细胞凋亡率增加( $P$ 均 $<0.05$ ),与既往研究结果一致<sup>[5]</sup>,上述说明TP的抗H3122CR作用与其下调DNMT3a介导的DNA甲基化有关。

研究表明miRNA通过调控DNMT3a表达,抑制肺癌细胞增殖和肿瘤生长<sup>[8]</sup>。研究表明miRNA-29c能与DNMT3a的3'端非编码区(3'-UTR)结合,下调DNMT3a表达,抑制DNMT3a甲基化活性,参与肿瘤的恶性生物学行为,而miRNA-29c在肺癌中呈低表达,提示低表达可能肺癌细胞过度增殖的原因之一<sup>[9]</sup>。有学者发现过表达miRNA-29c能够显著抑制肺癌细胞的增殖、侵袭和肿瘤生长<sup>[10]</sup>,本次研究结果显示10 nmol/L、25 nmol/L和50 nmol/L TP处理后,miRNA-29c表达明显增加( $P$ 均 $<0.05$ )。与miRNA-NC+TP组比较,miRNA-29c inhibitor+TP组DNMT3a蛋白和mRNA表达增加( $P$ 均 $<0.05$ ),提示TP通过上调miRNA-29c的表达抑制DNMT3a的表达。进一步研究发现,与miRNA-NC+TP组比较,miRNA-29c inhibitor+TP组细胞存活率、Bcl-2表达增加( $P$ 均 $<0.05$ ),细胞凋亡、cleaved-caspase3、Bax表达增加,说明TP通过增加miRNA-29c表达,发挥抗H3122CR细胞增殖作用。

综上所述,TP能够通过上调miRNA-29c,下调DNMT3a表达,抑制H3122CR细胞甲基化,进而发挥

抗H3122CR增殖作用。然而本次研究仅从细胞水平进行相关研究,缺乏在体研究,需进一步在体证实TP具有缓解克唑替尼耐药。另外,TP仍未应用于临床研究,开发其作为新型的抗肺癌药物仍有待更深入的研究。

### 参考文献

- 1 Cao M, Chen W. Epidemiology of lung cancer in China [J]. Thorac Cancer, 2019, 10(1): 3-7.
- 2 Didkowska J, Wojciechowska U, Manczuk M, et al. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide [J]. Ann Transl Med, 2016, 4(8): 150(1-11).
- 3 Mao Y, Yang D, He J, et al. Epidemiology of lung cancer [J]. Surg Oncol Clin N Am, 2016, 25(3): 439-445.
- 4 Wu YL, Yang J CH, Kim DW, et al. Phase II study of crizotinib in east asian patients with ros1-positive advanced non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2018, 36(14): 1405-1411.
- 5 Xie CQ, Zhou P, Zuo J, et al. Triptolide exerts pro-apoptotic and cell cycle arrest activity on drug-resistant human lung cancer A549/Taxol cells via modulation of MAPK and PI3K/Akt signaling pathways [J]. Oncol Lett, 2016, 12(5): 3586-3590.
- 6 Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, et al. Promoter hypermethylation of RASSF1A and RUNX3 genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers [J]. Lung Cancer, 2007, 58(1): 131-138.
- 7 Teneng I, Tellez CS, Picchi MA, et al. Global identification of genes targeted by DNMT3b for epigenetic silencing in lung cancer [J]. Oncogene, 2015, 34(5): 621-630.
- 8 Wang L, Yao J, Sun H, et al. MicroRNA-101 suppresses progression of lung cancer through the PTEN/AKT signaling pathway by targeting DNA methyltransferase 3A [J]. Oncol Lett, 2017, 13(1): 329-338.
- 9 Niu M, Gao D, Wen Q, et al. MiR-29c regulates the expression of miR-34c and miR-449a by targeting DNA methyltransferase 3a and 3b in nasopharyngeal carcinoma [J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 218(1-11).
- 10 Wang H, Zhu Y, Zhao M, et al. miRNA-29c suppresses lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by targeting integrin beta1 and matrix metalloproteinase 2 (MMP2) [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70192(1-11).

(收稿日期 2019-02-27)

(本文编辑 蔡华波)