

## · 论 著 ·

## 白藜芦醇通过 miR-324-5p/FUBP1 信号轴调控肝癌细胞增殖和凋亡

田国燕 顾磊

**[摘要]** 目的 探究白藜芦醇(RES)对 miR-324-5p 表达的调控及其在体外对肝细胞癌(HCC)细胞增殖和凋亡的影响。方法 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 RES 对 miR-324-5p 表达的调控;CCK8 实验和流式细胞术检测细胞增殖和凋亡情况;双荧光素酶报告基因和 Western blot 实验验证 miR-324-5p 的作用靶点。结果 RES 组经 RES 处理 SMMC-7721 细胞后,miR-324-5p 的表达为  $2.28 \pm 0.64$ , 明显高于对照组( $1.01 \pm 0.02$ ), 差异有统计学意义( $t=24.75, P<0.05$ )。miR-324-5p mimics 组在 SMMC-7721 细胞中转染 miR-324-5p mimics 后, 48 h 和 72 h 的细胞增殖活性明显低于 NC mimics 组( $t$  分别=10.39、18.14,  $P$  均 $<0.05$ )。RES+NC inhibitor 组在 48 h 和 72 h 的 SMMC-7721 细胞的增殖活性低于 NC inhibitor 组( $t$  分别=4.37、5.06,  $P$  均 $<0.05$ )。RES+miR-324-5p inhibitor 组在 72 h SMMC-7721 细胞中的增殖活性高于 RES+NC inhibitor 组( $t=5.21, P<0.05$ )。miR-324-5p mimics 组在 SMMC-7721 细胞中转染 miR-324-5p mimics 后, 细胞凋亡率高于 NC mimics 组( $t=11.50, P<0.05$ ); RES+NC inhibitor 组 SMMC-7721 细胞的凋亡率高于 NC inhibitor 组( $t=16.98, P<0.05$ ), RES+miR-324-5p inhibitor 组的细胞凋亡率低于 RES+NC inhibitor 组( $t=6.17, P<0.05$ )。通过 TargetScan 和 microRNA.org 数据库, 发现 FUBP1 是 miR-324-5p 的潜在作用靶点。与 NC mimics 组比较, miR-324-5p 过表达明显降低了 pmirGLO-FUBP1-wt 报告质粒的荧光素酶活性( $t=14.30, P<0.05$ )。Western blot 实验结果显示, 与 NC mimics 组比较, miR-324-5p mimics 组 FUBP1 蛋白的表达明显降低; 与 NC inhibitor 组比较, RES+NC inhibitor 组 SMMC-7721 细胞中 FUBP1 的蛋白表达明显降低, 而 RES+miR-324-5p inhibitor 组细胞中 FUBP1 的蛋白表达高于 RES+NC inhibitor 组。结论 RES 可通过 miR-324-5p/FUBP1 信号轴调控 HCC 细胞增殖和凋亡, RES 有望成为治疗 HCC 的有效药物。

**[关键词]** 白藜芦醇; 肝细胞癌; miR-324-5p; 增殖; 凋亡

**Resveratrol regulates proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by the signal axis of miR-324-5p/FUBP1** TIAN Guoyan, GU Lei. The Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, China.

**[Abstract]** **Objective** To investigate the regulation of resveratrol (RES) on the expression of miR-324-5p and its effect on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma (HCC) cells in vitro. **Methods** The qRT-PCR was used to detect the regulation of resveratrol on the expression of miR-324-5p. CCK8 and flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis of HCC cells. Luciferase reporter assays and Western blot were used to identify the target of miR-324-5p. **Results** After the SMMC-7721 cells were treated with RES, the expression of miR-324-5p in RES group was  $2.28 \pm 0.64$ , which was significantly higher than that in control group ( $1.01 \pm 0.02$ ), the difference was statistically significant ( $t=24.75, P<0.05$ ). After transfection of miR-324-5p mimics into SMMC-7721 cells, the cell proliferation activity of miR-324-5p mimics group at 48h and 72h was significantly lower than that of NC mimics group ( $t=10.39, 18.14, P<0.05$ ). The proliferation activity of SMMC-7721 cells in RES + NC inhibitor group at 48h and 72 h was lower than that in NC inhibitor group ( $t=4.37, 5.06, P<0.05$ ). The proliferation of SMMC-7721 cells in RES + miR-324-5p inhibitor group was significantly higher than that in RES + NC inhibitor group ( $t=5.21, P<0.05$ ). After miR-324-5p mimics was transfected into SMMC-7721 cells, the apoptosis rate was significantly higher than that of NC

mimics group ( $t=11.50, P<0.05$ ). The apoptosis rate of SMMC-7721 cells in RES + NC inhibitor group was significantly higher than that of NC in-

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.006.005

作者单位: 310015 浙江杭州, 杭州师范大学附属医院  
肿瘤血液科

hibitor group ( $t=16.98, P<0.05$ ), and the apoptosis rate of RES+miR-324-5p inhibitor group was lower than that of RES+NC inhibitor group ( $t=6.17, P<0.05$ ). Through targetscan and microRNA.org database, FUBP1 was found to be a potential target of miR-324-5p. Compared with NC mimics group, overexpression of miR-324-5p significantly reduced the luciferase activity of pmirGLO-FUBP1-wt report plasmid ( $t=14.30, P<0.05$ ). Western blot showed that the expression of FUBP1 protein in miR-324-5p mimics group was significantly lower than that in NC mimics group. Compared with NC inhibitor group, FUBP1 protein expression in SMMC-7721 cells in RES + NC inhibitor group was significantly lower, while FUBP1 protein expression in RES + miR-324-5p inhibitor group was higher than that in RES + NC inhibitor group. **Conclusion** RES regulates the proliferation and apoptosis of HCC cells through the signal axis of miR-324-5p/FUBP1, which is expected to be an effective agent for the treatment of HCC.

**[Key words]** resveratrol; hepatocellular carcinoma; miR-324-5p; proliferation; apoptosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是导致肿瘤相关死亡的主要原因之一,其在中国的发病率和病死率都很高<sup>[1]</sup>。尽管HCC的常规治疗方法(包括手术、化疗和放疗等)有所改进,但HCC患者的预后仍然很差。因此,制定新的HCC预防策略迫在眉睫。白藜芦醇(resveratrol, RES)是从葡萄、浆果、花生、虎杖等植物/药物中提取的一种多酚类化合物,可以通过影响不同的分子靶点,对结肠癌、肺癌、前列腺癌等多种肿瘤细胞具有抑制作用<sup>[2]</sup>。研究表明,RES可以通过上调抑癌微小RNA(microRNA, miRNA)或下调促癌miRNA的表达,进而在多种肿瘤中发挥抑癌作用<sup>[3,4]</sup>。本次研究拟通过研究RES对miR-324-5p表达的调控,进而探究RES通过调控miR-324-5p对HCC细胞的增殖和凋亡影响及其相应机制。

## 1 资料与方法

**1.1 细胞培养** 本次研究于2018年9月至2019年8月于杭州师范大学附属医院内完成。人HCC细胞系SMMC-7721购自美国ATCC公司,用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养,细胞培养环境为37℃,5%CO<sub>2</sub>。

**1.2 细胞处理和分组** 参考Chai等<sup>[5]</sup>研究中的细胞处理方法,采用110 μmol/L的RES适宜浓度处理SMMC-7721。用Lipofectamine 2000转染试剂(Thermo Fisher)将miR-324-5p mimics和miR-324-5p inhibitor转染入细胞。本次研究分组情况为:对照组(不加RES)和RES组(加RES处理);NC mimics组(转染NC mimics)和miR-324-5p mimics组(转染miR-324-5p mimics);NC inhibitor组(转染NC inhibitor)、RES+NC inhibitor组(RES处理并转染NC inhibitor)和RES+miR-324-5p inhibitor组(RES处理并转染miR-324-5p inhibitor)。

**1.3 qRT-PCR** 采用TRIzol试剂(由美国Ambion生产)提取细胞RNA。采用PrimeScript RT Master Mix(由美国Invitrogen生产)进行RNA逆转录。使用2×SYBR Premix Ex Taq II(由美国Invitrogen生产)进行实时qPCR,并使用ABI Prism 7300实时PCR系统(ABI)检测扩增信号,以GAPDH为内参,2<sup>-ΔΔCT</sup>法计算RES组和对照的miR-324-5p的相对表达量。引物序列:miR-324-5p-F: 5'-GAGGC-CAAGCCCTGGTATG-3'; miR-324-5p-R: 5'-CGGGCCGATTGATCTCAGC-3'; GAPDH-F: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACT-3'; GAPDH-R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

**1.4 细胞增殖** 实验细胞增殖实验采用CCK8试剂盒(由日本Dojindo公司生产)和酶标仪进行检测,以450 nm波长下的吸光度代表细胞的相对增殖活性。

**1.5 细胞凋亡检测** 各组细胞凋亡率使用Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(由上海Bestbio生产)及流式细胞仪进行检测。

**1.6 荧光素酶报告基因** 实验将野生型pmirGLO-FUBP1-wt及突变型pmirGLO-FUBP1-mut荧光素酶报告基因质粒与miR-324-5p mimics共转染到SMMC-7721细胞中。48 h后,用双荧光素酶报告基因试剂盒检测荧光素酶活性。

**1.7 Western blot** 细胞蛋白 采用RIPA裂解液(由碧云天公司生产)提取。采用SDS-PAGE凝胶进行电泳并用PVDF膜转膜后进行封闭。使用FUBP1和β-actin(由Abcam公司生产)一抗进行孵育,并采用化学发光成像系统采集图片。

**1.8 统计学方法** 采用SPSS 24.0和GraphPad Prism 7统计软件分析。计量资料组间比较采用 $t$ 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 RES在HCC细胞中上调miR-324-5p的表达 RES组经RES处理SMMC-7721细胞后, miR-324-5p的相对表达量为 $2.28 \pm 0.64$ ,明显高于

对照组( $1.01 \pm 0.02$ ),差异有统计学意义( $t=24.75, P<0.05$ )。

2.2 RES通过miR-324-5p调控HCC细胞增殖见图1、2

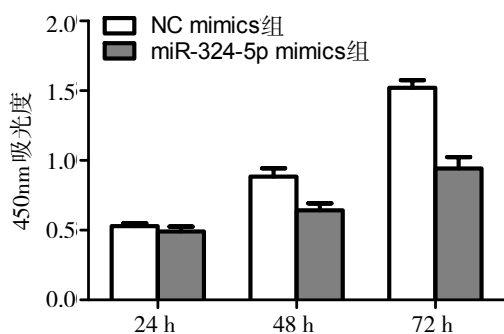


图1 miR-324-5p抑制SMMC-7721细胞增殖

由图1可见,miR-324-5p mimics组在SMMC-7721细胞中转染miR-324-5p mimics后,48 h和72 h的细胞增殖活性明显低于NC mimics组,差异均有统计学意义( $t$ 分别=10.39、18.14,  $P$ 均 $<0.05$ )。

由图2可见,RES+NC inhibitor组在48 h和72 h的SMMC-7721细胞的增殖活性低于NC inhibitor组,

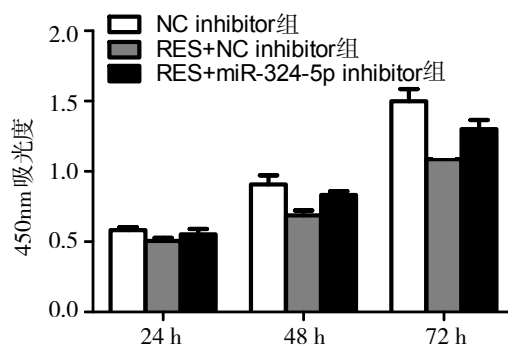


图2 RES通过miR-324-5p调控SMMC-7721细胞增殖

差异均有统计学意义( $t$ 分别=4.37、5.06,  $P$ 均 $<0.05$ )。RES+miR-324-5p inhibitor组在72 h SMMC-7721细胞的增殖活性高于RES+NC inhibitor组,差异有统计学意义( $t=5.21, P<0.05$ )。

2.3 RES通过miR-324-5p调控HCC细胞凋亡见图3、4

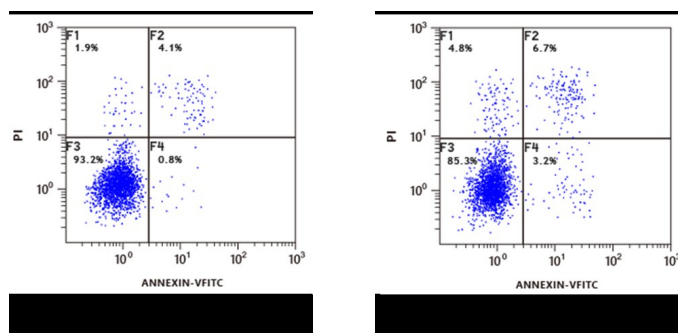


图3 miR-324-5p促进SMMC-7721细胞凋亡

由图3可见,miR-324-5p mimics组在SMMC-7721细胞中转染miR-324-5p mimics后,细胞凋亡

率高于NC mimics组,差异有统计学意义( $t=11.50, P<0.05$ )。

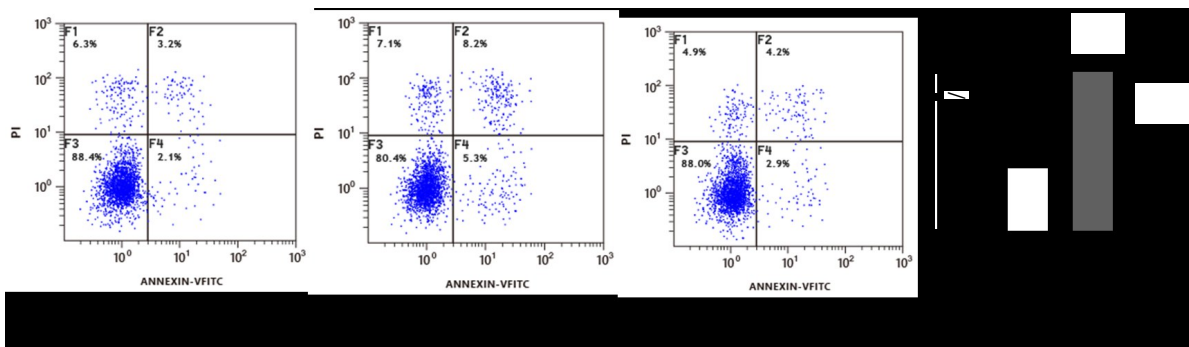


图4 RES通过miR-324-5p调控SMMC-7721细胞凋亡

由图4可见,RES+NC inhibitor组SMMC-7721细胞的凋亡率高于NC inhibitor组,差异有统计学

意义( $t=16.98, P<0.05$ ), RES+miR-324-5p inhibitor 组的细胞凋亡率低于 RES+NC inhibitor 组, 差异有统计学意义( $t=6.17, P<0.05$ )。

2.4 通过 TargetScan 和 microRNA.org 数据库, 发现 FUBP1 是 miR-324-5p 的潜在作用靶点。miR-324-5p 靶点的荧光素酶报告基因结果见图 5。

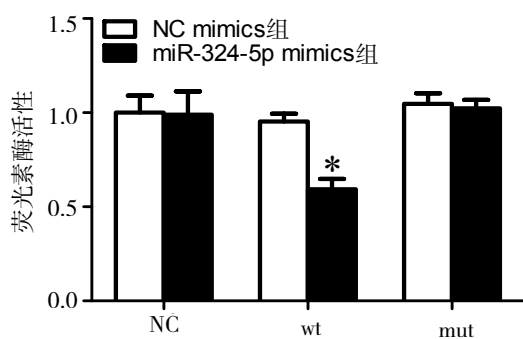


图5 miR-324-5p靶点的荧光素酶报告基因验证

由图 5 可见, 与 NC mimics 组比较, miR-324-5p 过表达明显降低了 pmirGLO-FUBP1-wt 报告质粒的荧光素酶活性, 差异有统计学意义( $t=14.30, P<0.05$ ), 而对 pmirGLO-FUBP1-mut 的荧光素酶活性无明显影响, 差异无统计学意义( $t=2.65, P>0.05$ )。

2.5 RES 通过 miR-324-5p 对 FUBP1 的表达影响见图 6、7

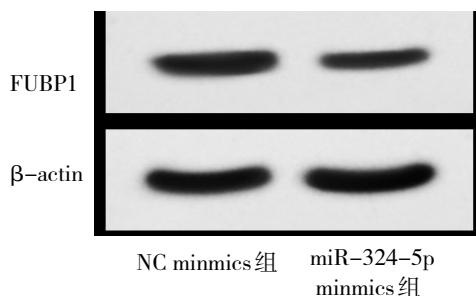


图6 miR-324-5p能够抑制FUBP1蛋白表达

由图 6 可见, Western blot 实验结果显示, 与 NC mimics 组比较, miR-324-5p mimics 组 FUBP1 蛋白的表达明显降低。

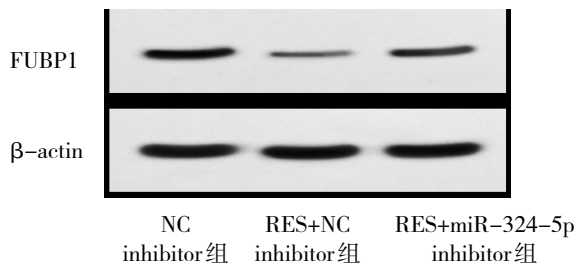


图7 RES通过miR-324-5p调控FUBP1蛋白表达

由图 7 可见, 与 NC inhibitor 组比较, RES+NC inhibitor 组 SMMC-7721 细胞中 FUBP1 的蛋白表达明显降低, 而 RES+miR-324-5p inhibitor 组细胞中 FUBP1 的蛋白表达高于 RES+NC inhibitor 组。

### 3 讨论

RES 是一种天然植物抗毒素, 一种由植物从合成的物质, 用来抵抗病原体的感染<sup>[6]</sup>。在以往的研究中, RES 已被证明通过降低高血压和对抗实验动物模型中的心力衰竭和缺血性心脏病来增强血管健康; 此外, 有充分的证据表明, RES 可以预防高脂肪饮食引起的肥胖, 提高胰岛素敏感性, 降低几种动物模型的血糖水平, 改善啮齿动物的糖尿病肾病; 同样, RES 在脑卒中的实验模型中也被证明具有神经保护作用<sup>[6]</sup>。

以往研究表明, RES 在肺癌、乳腺癌、前列腺癌及结肠癌等多种肿瘤中均表现出抗肿瘤潜力<sup>[6]</sup>。Wright 等<sup>[7]</sup>发现 RES 可通过特异性靶向磷酸化 Akt 诱导肺癌细胞凋亡, 并通过表皮生长因子受体依赖性蛋白酶体降解调节 c-FLIP; Sun 等<sup>[8]</sup>发现在乳腺癌细胞中 RES 改变了上皮细胞间质转化相关标记的表达, 且在体内 RES 可抑制 MDA231 人乳腺癌异种移植瘤小鼠模型的肺转移。以上研究均表明 RES 通过各种各样的机制在多种肿瘤中发挥抗癌作用, 本次研究发现 RES 能够抑制 HCC 细胞增殖并促进细胞凋亡, 起抗癌作用。

短期 RES 暴露明显降低肝细胞生长因子诱导的 c-Met 信号通路激活, 长期 RES 暴露明显抑制细胞膜上 c-Met 的表达; 此外, RES 抑制肝细胞生长因子诱导的细胞浸润, c-Met 基因敲除降低肝癌细胞对 RES 治疗的敏感性; 而且, 在异种移植模型中 RES 显示了明显的抗肿瘤活性, 能够明显抑制肿瘤生长<sup>[9]</sup>。RES 可上调肝癌细胞 p53 的表达, 降低磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)/Akt 的比值, 提示 RES 通过激活 p53 诱导自噬和抑制 PI3K/Akt 信号通路抑制肝癌细胞的增殖和迁移; 此外, 增强自噬能增强 RES 对肝癌的抗肿瘤作用<sup>[10]</sup>。尽管目前已有研究证实 RES 在 HCC 中发挥了抗肿瘤作用, 但具体机制尚待探究。

miRNA 是一种含有约 22 个核苷酸的短双链 RNA, 在转录后起调节蛋白质表达的作用。既往有研究报道称, 与正常组织比较, RES 可使肿瘤组织的 miR-21、miR-129、miR-204 及 miR-489 表达增加<sup>[11]</sup>。在肺癌中有研究证实 RES 可通过调节 miRNA-520 介导的信号级联抑制肺癌细胞叉头框蛋白 C2 的表

达,从而抑制肿瘤细胞活性<sup>[12]</sup>。本次实验结果显示,RES在HCC细胞中能够上调miR-324-5p的表达,并证实RES通过miR-324-5p影响HCC细胞增殖和凋亡。

本次实验进一步研究发现RES通过miR-324-5p抑制FUBP1的表达。已知FUBP1是一种癌基因,在多种肿瘤中异常表达,参与促增殖和抗凋亡等多种肿瘤生物学过程<sup>[13]</sup>。在HCC中,FUBP1在80%以上的HCC中高表达,且其作为一种重要的促增殖和抗凋亡的肿瘤蛋白,与单链DNA序列融合,调控多种靶基因的转录<sup>[14]</sup>。Rabenhorst等<sup>[15]</sup>证实FUBP1在HCC中的高表达,在小鼠异种移植模型中,HCC细胞中FUBP1的敲除导致对凋亡刺激的敏感性增加,细胞增殖减少,肿瘤形成受损;机制研究表明FUBP1可通过直接或间接抑制细胞周期抑制剂和促凋亡靶基因诱导肿瘤生长。本次实验表明RES能够通过miR-324-5p/FUBP1轴进而抑制HCC的肿瘤进程。

综上所述,体外细胞实验证实RES可通过miR-324-5p/FUBP1信号轴调控HCC细胞增殖和凋亡,RES有望成为治疗HCC的有效手段。然而本次实验仍有一定的局限性,RES在体内的作用仍需进一步的动物实验及人群研究加以证实。

#### 参考文献

- 1 Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10): 589-604.
- 2 赖丽琴, 魏红权. 白藜芦醇对人结肠癌细胞增殖、凋亡以及细胞周期的影响研究[J]. *浙江中医杂志*, 2016, 51(7): 488-489.
- 3 Zhang W, Jiang H, Chen Y, et al. Resveratrol chemosensitizes adriamycin-resistant breast cancer cells by modulating miR-122-5p[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 16283-16292.
- 4 Wu F, Cui L. Resveratrol suppresses melanoma by inhibiting NF- $\kappa$ B/miR-221 and inducing TGF expression[J]. *Arch Dermatol Res*, 2017, 309(10): 823-831.
- 5 Chai R, Fu H, Zheng Z, et al. Resveratrol inhibits proliferation and migration through SIRT1 mediated post-translational modification of PI3K/AKT signaling in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8037-8044.
- 6 Singh CK, Ndiaye MA, Ahmad N. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(6): 1178-1185.
- 7 Wright C, Iyer AKV, Yakisich JS, et al. Anti-tumorigenic effects of resveratrol in lung cancer cells through modulation of c-FLIP[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2017, 17(7): 669-680.
- 8 Sun Y, Zhou QM, Lu YY, et al. Resveratrol inhibits the migration and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer by reversing TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1131.
- 9 Gao F, Deng G, Liu W, et al. Resveratrol suppresses human hepatocellular carcinoma via targeting HGF-c-Met signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 1203-1211.
- 10 Zhang B, Yin X, Sui S. Resveratrol inhibited the progression of human hepatocellular carcinoma by inducing autophagy via regulating p53 and the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B pathway[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(5): 2758-2765.
- 11 Qin W, Zhang K, Clarke K, et al. Methylation and miRNA effects of resveratrol on mammary tumors vs. normal tissue[J]. *Nutr Cancer*, 2014, 66(2): 270-277.
- 12 Yu YH, Chen HA, Chen PS, et al. MiR-520h-mediated FOXC2 regulation is critical for inhibition of lung cancer progression by resveratrol[J]. *Oncogene*, 2013, 32(4): 431-443.
- 13 Zhang J, Chen QM. Far upstream element binding protein 1: a commander of transcription, translation and beyond[J]. *Oncogene*, 2013, 32(24): 2907-2916.
- 14 Khageh HS, Kolterer S, Steiner M, et al. Camptothecin and its analog SN-38, the active metabolite of irinotecan, inhibit binding of the transcriptional regulator and oncoprotein FUBP1 to its DNA target sequence FUSE[J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 146(1): 53-62.
- 15 Rabenhorst U, Beinoraviciute KR, Brezniceanu ML, et al. Overexpression of the far upstream element binding protein 1 in hepatocellular carcinoma is required for tumor growth[J]. *Hepatology*, 2009, 50(4): 1121-1129.

(收稿日期 2019-09-26)

(本文编辑 蔡华波)