

白藜芦醇通过上调miR-186-5p表达抑制肝癌细胞迁移、侵袭和上皮-间质转化

宋飞凤,张轶雯,潘宗富,张琪,卢茜璇,黄萍

浙江省人民医院 杭州医学院附属人民医院临床药学中心药学部,浙江 杭州 310014

[摘要] 目的:探讨白藜芦醇抑制肝癌细胞转移的分子机制。方法:利用CCK-8法检测白藜芦醇对肝癌细胞HepG2和Huh7存活率的影响,筛选后续实验适合的浓度;实时定量RT-PCR检测肝癌组织和肝癌细胞中miR-186-5p的表达;细胞划痕实验、Transwell小室实验和蛋白质印迹法分别检测白藜芦醇或miR-186-5p表达变化对肝癌细胞HepG2和Huh7迁移、侵袭和上皮-间质转化相关蛋白表达的影响。结果:6.25 μmol/L白藜芦醇对肝癌细胞HepG2和Huh7的存活率无显著影响,遂后续实验中白藜芦醇的浓度选择6.25 μmol/L。实验结果显示,白藜芦醇可以抑制肝癌细胞的迁移和侵袭,并增加上皮钙黏素表达,降低波形蛋白和Twist1表达(均 $P<0.05$)。与癌旁组织和正常肝细胞相比,肝癌组织和肝癌细胞中miR-186-5p表达均下调(均 $P<0.05$)。白藜芦醇能诱导肝癌细胞中miR-186-5p的表达(均 $P<0.01$)。上调miR-186-5p表达可显著抑制肝癌细胞的迁移、侵袭和上皮-间质转化(均 $P<0.05$),而敲低miR-186-5p表达能阻断白藜芦醇对肝癌细胞迁移、侵袭和上皮-间质转化的抑制作用。结论:白藜芦醇能体外抑制肝癌转移,其机制可能与上调miR-186-5p表达有关。



[关键词] 肝肿瘤;白藜芦醇;miR-186-5p;迁移;侵袭;上皮-间质转化;体外实验

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A

Resveratrol inhibits the migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in liver cancer cells through up-regulating miR-186-5p expression *in vitro*

SONG Feifeng, ZHANG Yiwen, PAN Zongfu, ZHANG Qi, LU Xixuan, HUANG Ping
(Department of Pharmacy, Clinical Pharmacy Center, Zhejiang Provincial People's Hospital, Affiliated People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China)

收稿日期:2021-07-19 接受日期:2021-09-10

基金项目:国家自然科学基金(82003853);浙江省自然科学基金(LQ20H310005, LYY21H310009);浙江省医药卫生科技计划(2021KY046)

第一作者:宋飞凤,主管药师,主要从事中药抑制肝癌转移的机制研究;E-mail:songfeifeng113@126.com;https://orcid.org/0000-0002-1720-6115

通信作者:黄萍,主任药师,博士生导师,主要从事肿瘤药理学研究;E-mail:huangping@hmc.edu.cn;https://orcid.org/0000-0002-5195-7369

Corresponding author: HUANG Ping, E-mail: huangping@hmc.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-5195-7369>

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the molecular mechanism of resveratrol inhibiting the metastasis of liver cancer *in vitro*. **Methods:** HepG2 and Huh7 cells were treated with different concentrations of resveratrol, and the cell viability was determined by CCK-8 assay to determine the optimal concentration of resveratrol for subsequent experiments. The expressions of miR-186-5p in liver cancer tissues and liver cancer cells were determined by quantitative real-time RT-PCR. The migration and invasion of HepG2 and Huh7 cells were detected by wound healing assay and Transwell assay, and the expression levels of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins were determined by Western blotting. **Results:** Resveratrol with concentration of 6.25 $\mu\text{mol/L}$ had no effect on the viability of HepG2 and Huh7 cells, so the concentration of resveratrol in subsequent experiments was 6.25 $\mu\text{mol/L}$. Resveratrol inhibited the wound healing and invasion of liver cancer cells; increased the expression of E-cadherin, and decreased the expression of vimentin and Twist1. The expression of miR-186-5p was significantly down-regulated in liver cancer tissues and cells compared with the adjacent tissues and normal liver cells (both $P < 0.05$). Furthermore, resveratrol induced the expression of miR-186-5p in liver cancer cells (both $P < 0.01$). Overexpression of miR-186-5p suppressed the migration, invasion and EMT of liver cancer cells. Knockdown of miR-186-5p blocked the inhibition effects of resveratrol on the migration, invasion and EMT of liver cancer cells. **Conclusion:** Resveratrol could inhibit the metastasis of liver cancer *in vitro*, which might be associated with up-regulating miR-186-5p.

[**Key words**] Liver neoplasms; Resveratrol; MiR-186-5p; Migration; Invasion; Epithelial-mesenchymal transition; *In vitro* experiment

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2021, 50(5): 582-590.]

[**缩略语**] 上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT); 微小RNA(micro-RNA, miRNA, miR); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH); 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP); 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene-fluoride, PVDF); 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO); 细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK); 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR); 互补DNA(complementary DNA, cDNA); Tris缓冲液含0.1%吐温-20(tris-buffered saline with Tween-20, TBST)

肝癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤之一,居所有肿瘤发病率和病死率的第四位和第二位,已成为严重威胁我国居民健康的一大疾病^[1]。肝细胞癌是肝癌最主要的组织学亚型,约占其总数的90%^[2]。尽管手术治疗、局部治疗和放射化疗等在肝癌中取得了一定的成效,但肝癌患者的5年存活率仍不足12%^[3-4]。肝癌患者的高病死率很

大程度上归因于患者在确诊时已发生转移。截至目前,肝癌转移尚无有效的治疗方法^[5-7]。因此,临床上亟须开发可用于肝癌转移的新的治疗药物。

白藜芦醇是一种非黄酮类多酚有机化合物,最早从毛叶藜芦的根中分离得到,目前发现其存在于藜芦、虎杖、葡萄等70多种植物中^[8]。研究表

明,白藜芦醇具有抑制血小板聚集、保护心血管、调节脂代谢、抗炎、抗氧化等多种生物学功能^[9]。近年研究发现,白藜芦醇对乳腺癌、结直肠癌、肝癌等多种肿瘤的发生发展均具有抑制作用,是潜在的辅助抗肿瘤化合物^[10-12]。有研究报道,白藜芦醇通过调控EMT相关蛋白表达抑制人乳腺癌细胞MDA-MB-231的转移^[13]。

已有多项研究报道,miRNA可以调控EMT,影响肿瘤转移^[14-16]。miRNA是一类长度为19~25个核苷酸的内源性单链非编码RNA分子,可与靶基因mRNA 3'端结合负向调控基因表达^[17]。Li等^[18]研究发现,miR-186-5p在结肠癌细胞中表达下调,miR-186-5p过表达可抑制肿瘤细胞EMT和转移;Shan等^[19]和Lan等^[20]均报道miR-186-5p在肝癌组织中的表达低于癌旁组织,因此推测miR-186-5p能调控EMT从而影响肝癌转移。为验证这一推测,本研究通过分子生物学方法考察白藜芦醇是否通过调控miR-186-5p影响EMT相关蛋白表达从而抑制肝癌转移。

1 材料与方法

1.1 细胞、临床标本、试剂和仪器

人肝癌细胞HepG2、Huh7和正常肝细胞HL-7702由浙江大学药学院曾苏教授实验室馈赠。

临床标本来源于浙江省人民医院接受外科手术切除肝癌患者的肝癌组织及其配对的癌旁组织。研究通过浙江省人员医院医学伦理委员会审批(IRB-2021QT074)。

白藜芦醇为上海MedChemExpress公司产品(精密称取一定量白藜芦醇粉末,将其溶解于DMSO溶液中,配制成250 mmol/L的储备液,冻存于-80℃备用)。Mir-X™ miRNA 第一链合成试剂盒、PrimeScript™ RT Reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品;兔抗上皮钙黏素(E-cadherin)、波形蛋白、Twist1、GAPDH为武汉三鹰生物技术有限公司产品;HRP标记山羊抗兔和HRP标记山羊抗鼠二抗为杭州联科生物技术股份有限公司产品;PVDF膜为美国Millipore公司产品;DMEM培养基、RPMI 1640培养基、DMSO、胎牛血清、胰蛋白酶、青-链霉素溶液为美国Gibco公司产品;CCK-8试剂盒为合肥白鲨生物科技有限公司产品;BCA蛋白浓度测定试剂盒为上海碧云天生物技术有限公司产品;石蜡包

埋组织切片总RNA提取试剂盒和RNAsimple总RNA提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品;Transwell(8 μmol/L)小室、基质胶Matrigel为美国Corning公司产品;jetPRIME转染试剂为法国Polyplus Transfection公司产品;miR-186-5p模拟物、miR-186-5p模拟物对照、miR-186-5p抑制剂、miR-186-5p抑制剂对照、miR-186-5p引物、U6内参引物由广州锐博生物科技有限公司合成。倒置显微镜(DMIL LED)为德国Leica公司产品;实时荧光定量PCR仪(LightCycler480)为美国Roche Diagnostics公司产品;垂直电泳转膜系统(PowerPac™ Basic)、凝胶成像系统(ChemiDoc XRS+)为美国Bio-Rad公司产品;酶标仪(Synergy LX)为美国BioTek公司产品。

1.2 实验设计及分组

首先考察白藜芦醇对肝癌转移(实验1)及miR-186-5p表达(实验2)的影响,设立溶剂对照组和白藜芦醇组;然后,考察miR-186-5p表达变化对肝癌转移的影响(实验3),设立miR-186-5p模拟物组和模拟物对照组;最后,考察白藜芦醇是否通过调控miR-186-5p表达来抑制肝癌细胞转移(实验4),设立miR-186-5p抑制剂+溶剂对照组、miR-186-5p抑制剂+白藜芦醇组、抑制剂对照+溶剂对照组、抑制剂对照+白藜芦醇组。

1.3 细胞培养

HepG2和Huh7细胞于含10%胎牛血清、1%青-链霉素的DMEM培养基中生长,HL-7702细胞于含10%胎牛血清、1%青-链霉素的RPMI 1640培养基中生长,所有细胞均放置于37℃、5%二氧化碳饱和湿度的培养箱中培养,待细胞汇合度达到80%~90%时进行传代。

1.4 CCK-8法检测细胞存活能力

将两种肝癌细胞分别以 5×10^3 /孔的密度接种于96孔板,接种24 h后分别给予含6.25、25.00、50.00、100.00、200.00、250.00 μmol/L白藜芦醇的培养液培养24 h,每孔加入CCK-8试剂10 μL,并于细胞培养箱放置1 h,用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度值,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=给药组吸光度值/空白对照组吸光度值×100%。

1.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

实验1:取指数生长期的肝癌细胞,以 1×10^6 /孔的密度接种于六孔板中,当细胞长满后用枪头在六孔板内划线,细胞用无血清的培养基清

洗三次后,于显微镜下观察并拍摄0 h的细胞图片,随后用含6.25 μmol/L白藜芦醇或DMSO的无血清培养基继续培养24 h,于显微镜下观察各组细胞划痕区域的填充程度。

实验3和实验4:取指数生长期的肝癌细胞,以 1×10^6 /孔接种于六孔板中,当细胞生长至50%密度时进行转染,分别将50 nmol/L miR-186-5p模拟物、miR-186-5p模拟物对照、miR-186-5p抑制剂、miR-186-5p抑制剂对照按照jetPrime转染试剂说明书要求操作,于37℃、5%二氧化碳饱和湿度的细胞培养箱中培养,24 h后用枪头在六孔板内划线,细胞用无血清的培养基清洗三次后显微镜下观察。miR-186-5p模拟物组用无血清培养基继续培养24 h, miR-186-5p抑制剂组分别用含6.25 μmol/L白藜芦醇或DMSO的无血清培养基继续培养24 h,于显微镜下观察各组细胞划痕区域的填充程度并计算创伤愈合率。创伤愈合率(%)=(0 h划痕面积-24 h划痕面积)/0 h划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.6 Transwell小室实验检测细胞侵袭能力

实验1:取指数生长期的肝癌细胞,以 1×10^5 /孔的密度接种于12孔板中,当细胞长满后用胰蛋白酶消化,细胞用无血清的培养基清洗三次,分别用含6.25 μmol/L白藜芦醇或DMSO的无血清培养基重悬细胞。

实验3和实验4:取指数生长期的肝癌细胞,以 1×10^5 /孔接种于12孔板中,当细胞生长至50%密度时进行转染,分别将50 nmol/L miR-186-5p模拟物、miR-186-5p模拟物对照、miR-186-5p抑制剂、miR-186-5p抑制剂对照按照jetPrime转染试剂说明书进行操作。转染24 h后用胰蛋白酶消化,用无血清的培养基清洗三次,miR-186-5p模拟物组用无血清培养基重悬细胞,miR-186-5p抑制剂组分别用含6.25 μmol/L白藜芦醇或DMSO的无血清培养基重悬细胞。

将BD基质胶用无血清的培养基稀释成250 μg/mL,提前铺于Transwell小室上层。各组以 5×10^5 /mL, 200 μL/孔接种于Transwell小室上层,下层加入600 μL含10%血清的培养基作为诱导剂,24 h后吸弃小室上层和下层培养基,用预热的磷酸盐缓冲液清洗三次,棉签轻轻擦去上层细胞,下层加入600 μL 4%多聚甲醛室温固定1 h,用预热的磷酸盐缓冲液清洗三次,下层加入600 μL结

晶紫染色,室温染色1 h,于显微镜下观察各组细胞染色程度。

1.7 实时定量RT-PCR测定miR-186-5p表达

实验2~3:临床手术标本分离后分别浸泡于10%多聚甲醛中,随后分别进行石蜡包埋保存。肝癌组织和癌旁组织石蜡标本($n=4$)按石蜡包埋组织切片总RNA提取试剂盒说明书操作。肝癌细胞经白藜芦醇处理后,收集细胞按RNAsimple总RNA提取试剂盒说明书操作。将提取的肝癌组织和细胞样本RNA按PrimeScriptTM RT Reagent Kit试剂盒说明书逆转录成cDNA,反应条件为:37℃ 15 min, 85℃ 5 s。按照SYBR Premix Ex TaqTM II试剂盒说明书进行PCR,反应条件为95℃预变性30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40个循环。每个样本平行三份,U6为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-186-5p相对表达量。

1.8 蛋白质印迹法测定上皮钙黏素、波形蛋白和Twist1蛋白表达

实验1:取指数生长期的肝癌细胞,以 1×10^6 /孔接种于六孔板中,当细胞生长至50%密度时分别用含6.25 μmol/L白藜芦醇或DMSO的培养基继续培养24 h,收集蛋白。

实验3:取指数生长期的肝癌细胞,以 1×10^6 /孔接种于六孔板中,当细胞生长至50%密度时进行转染,分别将50 nmol/L miR-186-5p模拟物、miR-186-5p模拟物对照按照jetPrime转染试剂说明书进行操作,转染24 h后收集蛋白。

实验4:取指数生长期的肝癌细胞,以 1×10^6 /孔接种于六孔板中,当细胞生长至50%密度时转染,分别将50 nmol/L miR-186-5p抑制剂、miR-186-5p抑制剂对照按照jetPrime转染试剂说明书操作,转染24 h后分别给予6.25 μmol/L白藜芦醇或DMSO处理24 h,收集蛋白。

蛋白收集过程如下:肝癌细胞经RIPA裂解液裂解提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。取蛋白样品(30 μg)经10% SDS-PAGE电泳分离,电泳,转膜,封闭,加入兔抗上皮钙黏素(1:5000)、鼠抗波形蛋白(1:5000)、兔抗Twist1(1:1000)、鼠抗GAPDH(1:10 000)孵育,4℃过夜,第2天用TBST洗膜3次,每次7 min,加HRP标记山羊抗兔二抗IgG(1:5000),山羊抗鼠二抗IgG(1:5000),室温孵育2 h, TBST洗膜3次,每次7 min,加电化学发光底物显色, Bio-Rad成像分析系统显

影成像。

1.9 统计学方法

采用GraphPad Prism 7.0软件对实验数据进行统计分析。正态分布的计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有体外实验均重复三次,每次至少平行三份,组间比较采用非配对双侧 *t* 检验, *P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇给药浓度选择

CCK-8法检测结果显示,相比于25.00、50.00、100.00、200.00、250.00 μmol/L这5个浓度,当白藜芦醇浓度为6.25 μmol/L时,HepG2和Huh7细胞存活率均较高,因此后续实验中白藜芦醇的给药终浓度设为6.25 μmol/L。

2.2 白藜芦醇体外抑制肝癌细胞迁移、侵袭和EMT

与溶剂对照组[创伤愈合率分别为(13.890±0.704)%和(9.813±0.850)%]比较,HepG2和Huh7细胞经6.25 μmol/L白藜芦醇处理24 h后,细胞迁移数均减少[创伤愈合率分别为(0.826±0.407)%和(3.687±1.419)%,均*P*<0.05],细胞侵袭数也减少(图1)。蛋白质印迹法测定结果显示,

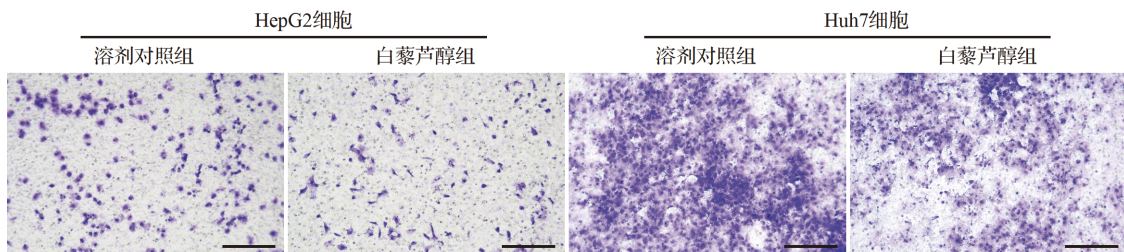
与溶剂对照组比较,HepG2和Huh7细胞白藜芦醇组上皮钙黏素表达均增加,波形蛋白和Twist1蛋白表达均减少(均*P*<0.05),见图2。结果提示,白藜芦醇能够体外抑制HepG2和Huh7细胞的迁移、侵袭和EMT。

2.3 miR-186-5p在肝癌组织和细胞中表达下调

肝癌组织和癌旁组织中miR-186-5p的表达量分别为0.425±0.061和1.000±0.216,差异有统计学意义(*t*=2.563,*P*<0.05)。HepG2、Huh7细胞和HL-7702细胞中miR-186-5p的表达量分别为0.081±0.015、0.049±0.010和1.000±0.121,两种肝癌细胞与正常肝细胞差异均有统计学意义(*t*=9.989和10.460,均*P*<0.01)。结果提示,肝癌组织和肝癌细胞中miR-186-5p表达下调。

2.4 白藜芦醇能诱导miR-186-5p在肝癌细胞中表达

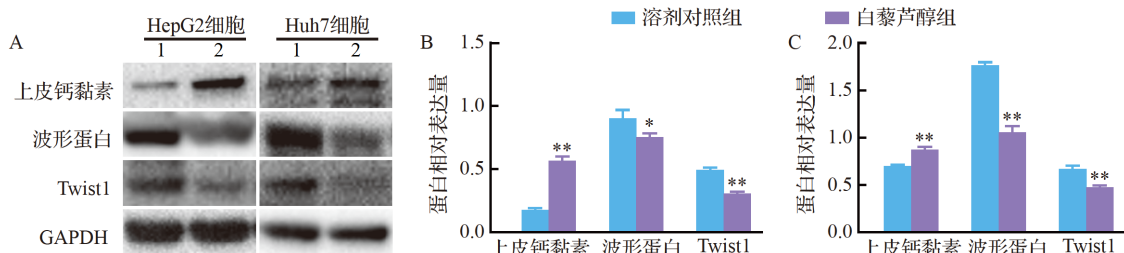
HepG2细胞白藜芦醇组和溶剂对照组中miR-186-5p的表达量分别为1.476±0.055和1.000±0.027,Huh7细胞白藜芦醇组和溶剂对照组中miR-186-5p的表达量分别为1.474±0.111和1.000±0.012,两种肝癌细胞白藜芦醇组的miR-186-5p表达与溶剂对照组相比均上调(*t*=8.978和4.239,均*P*<0.01),提示白藜芦醇可诱导miR-186-5p



与溶剂对照组比较,HepG2和Huh7细胞白藜芦醇组侵袭细胞数均减少。标尺=250 μm。

图1 溶剂对照组和白藜芦醇组侵袭细胞观察

Figure 1 Invasion of HepG2 and Huh7 cells treated with resveratrol or not



A:两组上皮-间质转化相关蛋白电泳图(1:溶剂对照组,2:白藜芦醇组);B:HepG2细胞蛋白相对表达量比较;C:Huh7细胞蛋白相对表达量比较。与溶剂对照组比较,**P*<0.05,***P*<0.01。GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图2 溶剂对照组和白藜芦醇组细胞上皮-间质转化相关蛋白表达比较

Figure 2 Comparison of the EMT-related proteins expression in HepG2 and Huh7 cells treated with resveratrol or not

在肝癌细胞中的表达。

2.5 miR-186-5p高表达抑制肝癌细胞迁移、侵袭和EMT

HepG2和Huh7细胞中miR-186-5p模拟物组miR-186-5p的表达量分别为 761.800 ± 17.140 和 28.720 ± 1.259 ,模拟物对照组的表达量分别为 1.000 ± 0.038 和 1.000 ± 0.029 ,差异均有统计学意义($t=44.390$ 和 29.530 ,均 $P<0.01$),提示肝癌细胞中miR-186-5p过表达成功。细胞划痕实验和Transwell小室实验结果显示,miR-186-5p模拟物组细胞迁移减少(图3),细胞侵袭数也少于模拟物对照组(图4)。与模拟物对照组比较,miR-186-5p模拟物能促进上皮钙黏素表达,抑制波形蛋白和Twist1蛋白表达(图3、5)。结果提示,miR-186-5p高表达能够抑制HepG2和Huh7细胞迁移、侵袭和EMT。

2.6 敲低miR-186-5p能阻断白藜芦醇抑制肝癌细胞迁移、侵袭和EMT

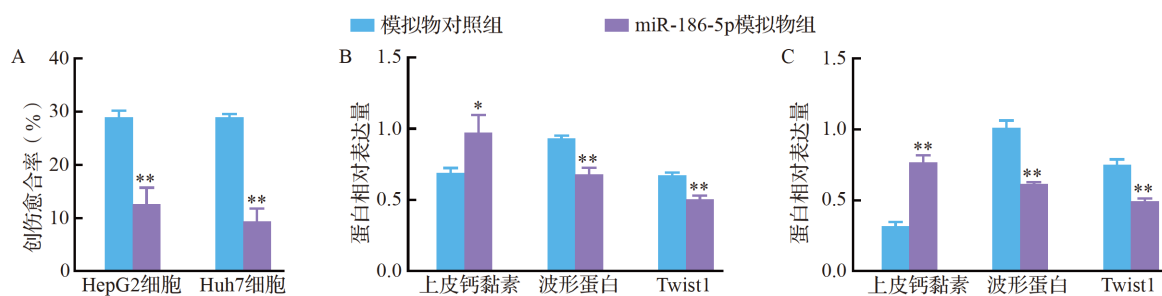
两种细胞抑制剂对照组和miR-186-5p抑制剂组中,与溶剂对照组比较,白藜芦醇组细胞的创伤愈合能力减弱,细胞的侵袭数减少,上皮钙黏素表

达增加,波形蛋白和Twist1蛋白表达较少(均 $P<0.05$)。与抑制剂对照+白藜芦醇组比较,miR-186-5p抑制剂+白藜芦醇组细胞的创伤愈合能力增强,细胞侵袭数增加,上皮钙黏素表达减少,波形蛋白和Twist1蛋白表达增加(均 $P<0.05$)。结果见图6~8,提示白藜芦醇能通过诱导miR-186-5p促进肝癌迁移、侵袭和EMT。

3 讨论

白藜芦醇是多种药用植物的生物活性成分之一,具有抗炎、抗氧化、心脏保护和抗肿瘤等特性,其在动物和人体中已显示良好的安全性^[21-22]。研究表明,白藜芦醇对包括乳腺癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌等在内的多种肿瘤细胞均具有显著的体外细胞毒作用,而且对肿瘤进展也具有抑制作用^[23]。本研究结果证实,白藜芦醇可通过上调miR-186-5p表达体外抑制肝癌迁移和侵袭,其机制可能与调控肝癌细胞EMT相关蛋白的表达有关。

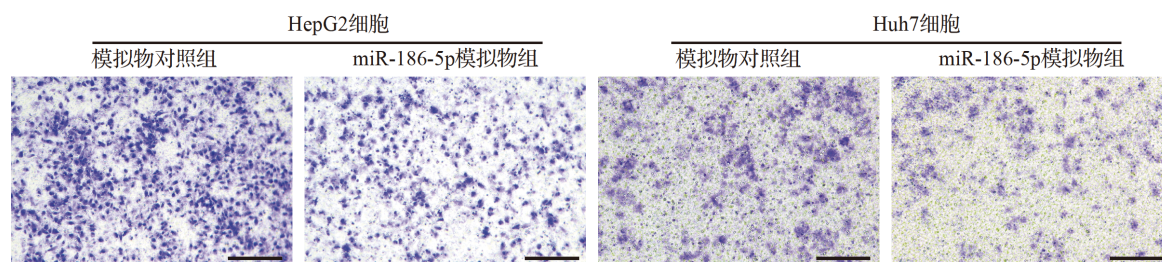
肿瘤转移是肝癌患者病死率高的主要原因之一。肿瘤转移与多个生物学过程密切相关,如细胞



A: 两组创伤愈合率比较; B: HepG2细胞蛋白相对表达量比较; C: Huh7细胞蛋白相对表达量比较. 与模拟物对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图3 miR-186-5p模拟物组和模拟物对照组创伤愈合能力及上皮-间质转化相关蛋白表达量比较

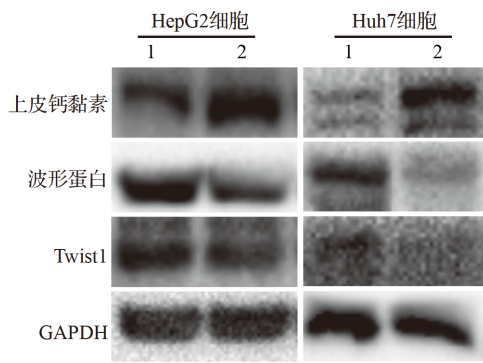
Figure 3 Wound healing rates and the EMT-related proteins expression in HepG2 and Huh7 cells treated with mimic control or miR-186-5p mimic



与模拟物对照组比较,两种肝癌细胞miR-186-5p模拟物组侵袭细胞数减少.标尺=250 μm.

图4 miR-186-5p模拟物组和模拟物对照组Transwell小室实验结果

Figure 4 Invasion of HepG2 and Huh7 cells treated with mimic control or miR-186-5p mimic

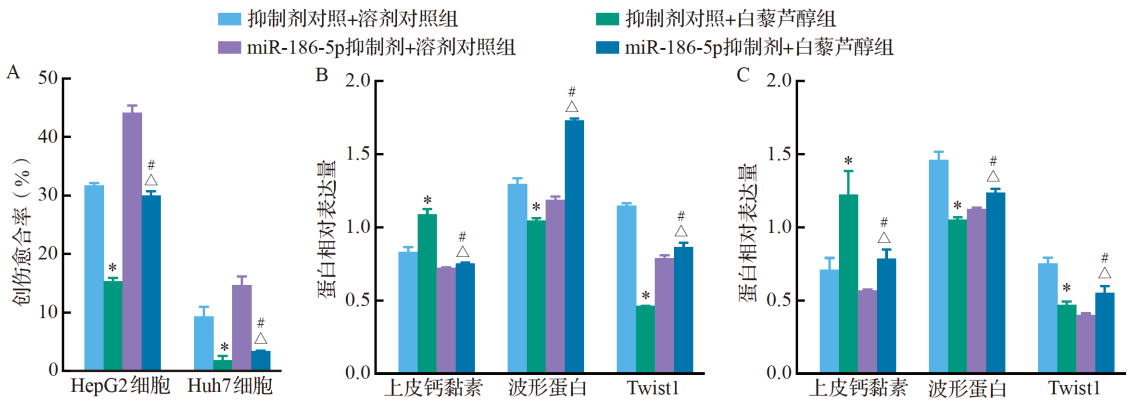


1: 模拟物对照组;2: miR-186-5p模拟物组. GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶.

图5 miR-186-5p高表达肝癌细胞上皮-间质转化相关蛋白电泳图

Figure 5 miR-186-5p overexpression influenced EMT-related proteins expression in HepG2 and Huh7 cells

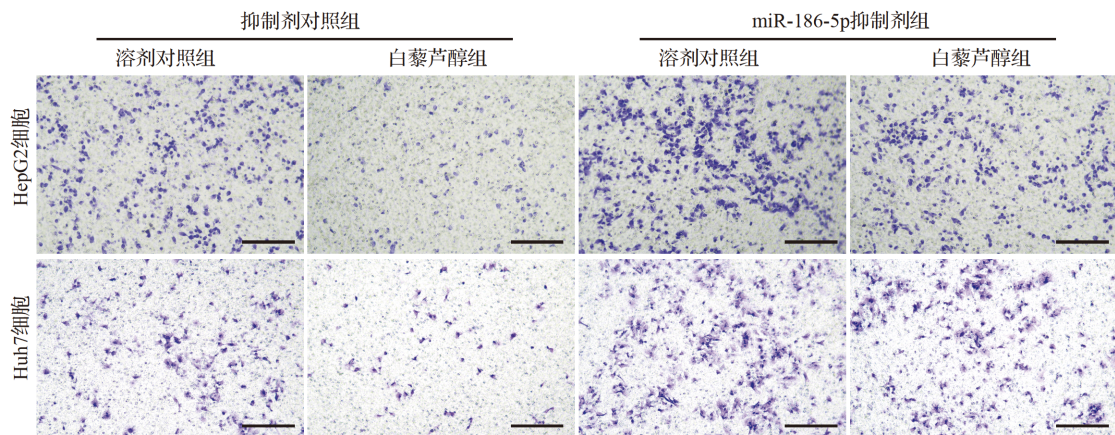
外基质降解、EMT、免疫逃逸、循环肿瘤细胞等。近年来大量研究发现,EMT是肝癌转移的重要机制之一,并且基于EMT信号通路已发现多个肝癌转移治疗的潜在靶点,但相应药物的研发极为匮乏^[24-26]。目前已有多项研究表明,白藜芦醇能通过抑制EMT信号通路阻碍肿瘤的侵袭和转移^[27]。Wang等^[28]研究发现,白藜芦醇通过上调上皮钙黏素表达,降低波形蛋白、Fibronectin、Slug和Snai1表达从而抑制A549肺癌细胞的EMT。Ji等^[29]研究发现,白藜芦醇通过降低Smad2/3表达抑制EMT,进而抑制结肠癌的侵袭和转移。此外,有研究者发现,白藜芦醇能通过调控EMT相关蛋白和PI3K/Akt/NF-κB信号通路抑制胰腺癌细胞PANC-1转移^[30]。然而白藜芦醇能否通过调控EMT信号通路影响肝癌转移鲜见报道。本文资料显示,白



A: 各组创面愈合率比较; B: HepG2细胞蛋白相对表达量比较; C: Huh7细胞蛋白相对表达量比较。与抑制剂对照+溶剂对照组比较, *P<0.05; 与miR-186-5p抑制剂+溶剂对照组比较, #P<0.05; 与抑制剂对照+白藜芦醇组比较, ΔP<0.05。

图6 miR-186-5p抑制剂和白藜芦醇合用与否各组创面愈合能力及上皮-间质转化相关蛋白表达量比较

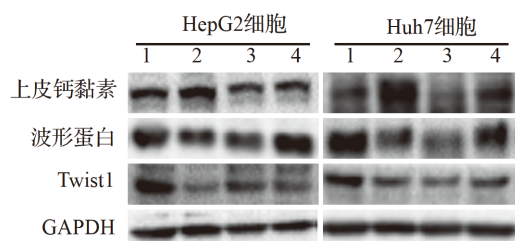
Figure 6 Wound healing rates and the EMT-related proteins expression in each group



与溶剂对照组比较,白藜芦醇组侵袭细胞数减少。与抑制剂对照+白藜芦醇组比较,miR-186-5p抑制剂+白藜芦醇组侵袭细胞数增加。标尺=250 μm。

图7 miR-186-5p抑制剂和白藜芦醇合用与否各组细胞侵袭数变化

Figure 7 Knockdown of miR-186-5p blocked the inhibition effect of resveratrol on the invasion of HepG2 and Huh7 cells



1. 抑制剂对照+溶剂对照组;2. 抑制剂对照+白藜芦醇组;3. miR-186-5p抑制剂+溶剂对照组;4. miR-186-5p抑制剂+白藜芦醇组。GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图8 miR-186-5p抑制剂和白藜芦醇合用与否各组细胞EMT相关蛋白表达比较

Figure 8 Electrophoretogram of EMT-related proteins in HepG2 and Huh7 cells treated with miR-186-5p inhibitor plus resveratrol or not

藜芦醇能抑制肝癌细胞HepG2和Huh7的迁移和侵袭,并且增加肝癌细胞中上皮钙黏素表达,降低波形蛋白和Twist1表达,提示白藜芦醇抑制肝癌转移可能通过调控EMT信号通路。

miRNA在肝癌转移中发挥着重要作用,并有可能成为肝癌转移治疗的潜在靶点。通过比较肝癌组织和癌旁组织中miRNA的表达,目前已发现有几百种miRNA与肝癌发生发展密切相关^[31]。研究发现,miR-186-5p在多个肿瘤中异常表达,如在结肠直肠癌和膀胱癌患者中miR-186-5p表达下调^[18,32]。本文资料显示,肝癌组织和肝癌细胞(HepG2和Huh7)中miR-186-5p的表达分别显著低于癌旁组织和正常肝细胞;白藜芦醇能诱导肝癌细胞中miR-186-5p的表达,但miR-186-5p在肝癌转移特别是EMT中的功能尚不明确。EMT是上皮细胞失去细胞极性和细胞黏附能力的过程,进而导致肿瘤转移^[33]。大量研究表明,miRNA在调控EMT相关基因表达中发挥着重要作用。已有研究报道,miR-200和miR-205家族成员均能通过靶向结合转录因子ZEB1/2抑制EMT^[34]。另有研究发现,miR-155通过靶向RhoA蛋白在调控EMT中也具有重要作用^[35]。然而,多数miRNA在EMT中的生物学功能仍有待阐明。Li等^[18]研究发现,上调miR-186-5p可抑制结肠癌细胞增殖、转移和EMT。由此推测,白藜芦醇可能通过上调miR-186-5p影响肝癌细胞EMT相关蛋白表达进而抑制肝癌转移。本文资料证实,肝癌细胞HepG2和Huh7中过表达miR-186-5p可抑制肝癌细胞的迁移、侵袭和EMT;而敲低miR-186-5p可逆转白藜芦醇对肝癌细胞迁移、侵袭和EMT的抑制作用。

综上所述,白藜芦醇可通过上调miR-186-5p表达体外抑制肝癌细胞迁移和侵袭,机制可能与miR-186-5p调控EMT相关蛋白表达有关。白藜芦醇上调miR-186-5p调控EMT相关蛋白表达的药效学和作用机制尚需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] ZHENG R S, SUN K X, ZHANG S W, et al. Report of cancer epidemiology in China, 2015[J]. *Chin J Oncol*, 2019, 41(1): 19-28.
- [2] LV J, ZHANG S, WU H, et al. Deubiquitinase PSMD14 enhances hepatocellular carcinoma growth and metastasis by stabilizing GRB2[J]. *Cancer Lett*, 2020, 469: 22-34.
- [3] CHEN T W, YIN F F, YUAN Y M, et al. CHML promotes liver cancer metastasis by facilitating Rab14 recycle[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2510-2514.
- [4] L'HERMITTE A, PHAM S, CADOUX M, et al. Lect2 controls inflammatory monocytes to constrain the growth and progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2019, 69(1): 160-178.
- [5] HAIDER C, HNAT J, WAGNER R, et al. Transforming growth factor- β and axl induce CXCL5 and neutrophil recruitment in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2019, 69(1): 222-236.
- [6] YUAN T, CHEN Z, YAN F, et al. Deubiquitinating enzyme USP10 promotes hepatocellular carcinoma metastasis through deubiquitinating and stabilizing smad4 protein[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(1): 197-210.
- [7] KIM E, KIM D, LEE J S, et al. Capicua suppresses hepatocellular carcinoma progression by controlling the ETV4-MMP1 axis[J]. *Hepatology*, 2018, 67(6): 2287-2301.
- [8] HUANG X, ZHU H L. Resveratrol and its analogues: promising antitumor agents[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, 11(5): 479-490.
- [9] RAUF A, IMRAN M, SULERIA H A R, et al. A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol[J]. *Food Funct*, 2017, 8(12): 4284-4305.
- [10] VARGAS J E, PUGA R, LENZ G, et al. Cellular mechanisms triggered by the cotreatment of resveratrol and doxorubicin in breast cancer: a translational *in vitro*-*in silico* model[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020(2): 5432651.
- [11] KUO I M, LEE J J, WANG Y S, et al. Potential enhancement of host immunity and anti-tumor efficacy of nanoscale curcumin and resveratrol in colorectal cancers by modulated electro-hyperthermia[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 603.

- [12] YANG H, ZHENG Y, LI T W H, et al. Methionine adenosyltransferase 2B, HuR, and sirtuin 1 protein cross-talk impacts on the effect of resveratrol on apoptosis and growth in liver cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(32): 23161-23170.
- [13] SUN Y, ZHOU Q M, LU Y Y, et al. Resveratrol inhibits the migration and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer by reversing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1131-1146.
- [14] PETRI B J, KLINGE C M. Regulation of breast cancer metastasis signaling by miRNAs[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2020, 39(3): 837-886.
- [15] KIM T W, LEE Y S, YUN N H, et al. MicroRNA-17-5p regulates EMT by targeting vimentin in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2020, 123(7): 1123-1130.
- [16] CHAN S H, WANG L H. Regulation of cancer metastasis by microRNAs[J]. *J Biomed Sci*, 2015, 22(1): 9-20.
- [17] LOU W, LIU J, GAO Y, et al. MicroRNA regulation of liver cancer stem cells[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(7): 1126-1141.
- [18] LI J, XIA L, ZHOU Z, et al. MiR-186-5p upregulation inhibits proliferation, metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal cancer cell by targeting ZEB1[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 640: 53-60.
- [19] SHAN Y, LI P. Long intergenic non-protein coding RNA 665 regulates viability, apoptosis, and autophagy via the MiR-186-5p/MAP4K3 axis in hepatocellular carcinoma[J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(9): 842-853.
- [20] LAN T, YAN X, LI Z, et al. Long non-coding RNA PVT1 serves as a competing endogenous RNA for miR-186-5p to promote the tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): 101042831770533.
- [21] SMOLIGA J M, BAUR J A, HAUSENBLAS H A. Resveratrol and health—a comprehensive review of human clinical trials[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(8): 1129-1141.
- [22] BROWN V A, PATEL K R, VISKADURAKI M, et al. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22): 9003-9011.
- [23] KO J H, SETHI G, UM J Y, et al. The role of resveratrol in cancer therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2589.
- [24] YUAN K, XIE K, LAN T, et al. TXNDC12 promotes EMT and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via activation of β -catenin[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(4): 1355-1368.
- [25] ZHAO Y R, WANG J L, XU C, et al. HEG1 indicates poor prognosis and promotes hepatocellular carcinoma invasion, metastasis, and EMT by activating Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Clin Sci*, 2019, 133(14): 1645-1662.
- [26] MENG J, AI X, LEI Y, et al. USP5 promotes epithelial-mesenchymal transition by stabilizing SLUG in hepatocellular carcinoma[J]. *Theranostics*, 2019, 9(2): 573-587.
- [27] XU Q, ZONG L, CHEN X, et al. Resveratrol in the treatment of pancreatic cancer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1348(1): 10-19.
- [28] WANG H, ZHANG H, TANG L, et al. Resveratrol inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses lung cancer invasion and metastasis[J]. *Toxicology*, 2013, 303: 139-146.
- [29] JI Q, LIU X, HAN Z, et al. Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- β 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15(1): 97.
- [30] LI W, MA J, MA Q, et al. Resveratrol inhibits the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via suppression of the PI-3K/Akt/NF- κ B pathway[J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(33): 4185-4194.
- [31] WANG X, GAO J, ZHOU B, et al. Identification of prognostic markers for hepatocellular carcinoma based on miRNA expression profiles[J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116596.
- [32] ZHANG Q, HAO L, SHEN Z, et al. MiR-186-5p suppresses cell migration, invasion, and epithelial mesenchymal transition in bladder cancer by targeting RAB27A/B[J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(11): 2174-2185.
- [33] BRABLETZ T, KALLURI R, NIETO M A, et al. EMT in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(2): 128-134.
- [34] GREGORY P A, BERT A G, PATERSON E L, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(5): 593-601.
- [35] KONG W, YANG H, HE L, et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor β /Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(22): 6773-6784.

[本文编辑 余方 刘丽娜]

